Hormonelle Langzeitregulation von Glykogengehalt, Gluconeogenese und Glucose-6-Phosphatase in Primärkulturen von Rattenhepatozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
GERHARD SCHIRMER
aus Walldürn

1983

Hormonelle Langzeitregulation von Glykogengehalt, Gluconeogenese und Glucose-6-Phosphatase in Primärkulturen von Rattenhepatozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
GERHARD SCHIRMER
aus Walldürn

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	9. August 1983
Dekan:	Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Professor Dr. A. Wendel

Meiner Mutter

Abstract

Schirmer, Gerhard:
HORMONELLE LANGZEITREGULATION VON GLYKOGENGEHALT, GLUCONEOGENESE UND GLUCOSE-6-PHOSPHATASE IN PRIMÄRKULTUREN VON RATTENHEPATOZYTEN

An Primärkulturen von Rattenhepatozyten wurde der längerfristige Einfluß verschiedener Hormone (Insulin, Glucagon, Dexamethason) auf leberspezifische Funktionen aus dem Bereich des Kohlenhydratstoffwechsels untersucht.
Im Hinblick auf den Glykogengehalt lassen sich in der Kultur zwei Phasen unterscheiden: eine anfängliche (1 Tag), die im wesentlichen durch glykogenolytische Vorgänge charakterisiert ist, gefolgt von einer Phase, in der unter bestimmten Bedingungen (Insulin, hohe Glucose oder gluconeogenetische Bedingungen) unter dem permissiven Einfluß von Glucocorticoid (Dex) wieder hohe Glykogenspiegel aufgebaut werden können.
Die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten von gefütterter und gehungerter Ratte wird durch Dexamethason-Vorbehandlung (Dex, Dex/Gluca, Dex/Gluca/Ins) auf hohem Niveau aufrechterhalten (>50 % nach 4 Tagen). Kultivierung in Abwesenheit von Glucocorticoid, insbesondere in alleiniger Anwesenheit von Glucagon, führt zu einem drastischen Verlust der Fähigkeit der Zellen zur stimulierten Gluconeogenese; dieser kann durch Dex-Behandlung rückgängig gemacht werden.
Die Fähigkeit der Hepatozyten zur Harnstoffsynthese aus den Aminosäuren des Mediums bleibt unter verschiedenen Hormonbedingungen (± Dex ± Gluca) in hohem Maße erhalten (60 - 90 % nach 4 Tagen) und ist durchgehend mit Glucagon stimulierbar.
Die hormonelle Regulation (Ins, Dex, T3, Gluca) der Glucose-6-Phosphatase und deren Aktivitätsverteilung innerhalb der Monolayer wurde an Hepatozyten von gefütterter Ratte untersucht. In L15(mod.)-Medium wurde in Anwesenheit von Dex/T3/Gluca eine Stabilisierung der G6Pase-Aktivität beobachtet (70 - 80 % nach 4 Tagen), während dieselben Hormone in W/AB-77-Medium einen nur marginalen Effekt auf die drastische Abnahme in Medium ohne Hormonsupplemente zeigten. Supplementierungsexperimente ergaben, daß mehrere Komponenten des L15-Mediums in komplexem Zusammenwirken die Hormonwirkung permissiv beeinflussen.
Die zytochemische Lokalisierung der G6Pase ergab, daß eine zu Beginn der Kultur entsprechend der in vivo-Verteilung vorgefundene heterogene Enzymausstattung der einzelnen Hepatozyten unter stabilisierenden Kulturbedingungen (L15(mod.) + Dex/T3/Gluca; W/AB-77(suppl.) + Dex/T3/Gluca) während 4-tägiger Kultivierung erhalten bleibt, während unter nicht-stabilisierenden Medienbedingungen bereits nach 3 Tagen eine praktisch vollständige Nivellierung auf niedrigem Aktivitätsniveau zu beobachten ist.

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Herrn Dr. R. Gebhardt in der Zeit von Oktober 1978 bis Juli 1983 am Lehrstuhl II des Physiologisch-chemischen Institutes der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Mecke danke ich für sein stetes Interesse und die wohlwollende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. R. Gebhardt bin ich in besonderer Weise zu Dank verpflichtet für die langjährige gute Zusammenarbeit, die gekennzeichnet war von seiner steten Bereitschaft zur Beratung und Diskussion anstehender Probleme.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen Laborkollegen für die Mitarbeit bei der Präparation und Kultivierung von Hepatozyten, für viele anregende Gespräche und für ein angenehmes, von Interesse und Hilfsbereitschaft geprägtes Klima. Hervorheben möchte ich hier stellvertretend Frl. M. Behringer und Frl. A. Schneck, Herrn Dipl.-Biochem. A. Gnekow, Herrn Dr. W. Jung, Herrn Dr. H. Metzler, Herrn Dipl.-Biochem. W. Schulz, Herrn R. Tacke und Herrn Dipl.-Biochem. K. Valentin.

Mein besonderer Dank gilt auch Frl. Gisa Tiegs, ohne deren Mitarbeit mancher Versuch vom Umfang her nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Primärkulturen von Hepatozyten als experimentelles System	1
1.2.	Glykogenstoffwechsel	4
1.3.	Harnstoffsynthese	7
1.4.	Gluconeogenese	9
1.5.	Glucose-6-Phosphatase	11
1.5.1.	Lokalisierung und Eigenschaften	11
1.5.2.	Die physiologische Bedeutung der G6Pase	14
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	18
2.1.	Versuchstiere	18
2.2.	Geräte	18
2.3.	Verbrauchsmittel	19
2.3.1.	Materialien	19
2.3.2.	Chemikalien, Enzyme, Hormone	19
2.4.	Lösungen und Kulturmedien	20
2.4.1.	Lösungen für die Zellisolation	20
2.4.2.	W/AB-77-Medium	21
2.4.3.	Modifiziertes L15-Medium	22
2.4.4.	Halbsynthetisches Kulturmedium	22
2.4.5.	Stammlösungen von Hormonen und Agenzien	22
2.5.	Isolierung der Leberparenchymzellen	24
2.6.	Kultivierung der Hepatozyten	25
2.6.1.	Kollagenisolierung und Beschichten der Kulturschalen	25
2.6.2.	Absetzen und Kultivieren der Hepatozyten	26
2.6.3.	Kultivierung und Inkubation in Anwesenheit von Hormonen	26
2.6.4.	Inkubation zur Messung der Glucosebilanz	27

		Seite
2.7.	Biochemische Messungen	28
2.7.1.	Ernten der Zellen und Herstellen der Homogenate	28
2.7.2.	Proteinbestimmung	29
2.7.3.	Messung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität (EC 3.1.3.9)	29
2.7.4.	Metabolitbestimmungen	30
2.7.4.1.	Aufbereiten des Kulturmediums zur Bestimmung von Metaboliten	30
2.7.4.2.	Bestimmung von Harnstoff	31
2.7.4.3.	Bestimmung von Lactat	31
2.7.4.4.	Bestimmung von Glucose	31
2.7.4.5.	Bestimmung von Glykogen	32
2.8.	Zytochemische Lokalisierung der Glucose-6-Phosphatase	35
2.9.	Darstellung der Ergebnisse	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1.	Glykogen	38
3.1.1.	Glykogenspiegel in kultivierten Hepatozyten von gefütterter Ratte	39
3.1.1.1.	Isolierung und Absetzphase	39
3.1.1.2.	Einfluß verschiedener Hormonbedingungen während mehrtägiger Kultivierung im Normalmedium	40
3.1.1.3.	Einfluß hoher Glucosekonzentrationen	42
3.1.1.4.	Einfluß gluconeogenetischer Substrate	45
3.1.1.5.	Zeitlicher Verlauf der Glykogenspiegel während der Inkubationsperiode zur Bestimmung der Glucosebilanz	48
3.1.2.	Glykogenspiegel in kultivierten Hepatozyten von gehungerter Ratte	51
3.2.	Gluconeogenese	53
3.2.1.	Charakterisierung der gluconeogenetischen Kapazität	53
3.2.1.1.	Zeitlicher Verlauf der Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Bedingungen während 24-stündiger Inkubation	53

Seite

3.2.1.2.	Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen auf Glucosebilanz und Harnstoffsynthese	59
3.2.1.2.1.	Hepatozyten von gehungertem Tier	60
3.2.1.2.2.	Hepatozyten vom gefütterten Tier	64
3.2.2.	Einfluß der Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die Relationen zwischen Glucosebildung, Lactatverbrauch und Harnstoffsynthese	71
3.2.2.1.	Kultivierung unter ± Dexamethason ± Glucagon	71
3.2.2.2.	Einfluß des Umsetzens von Glucagon auf Dexamethason	74
3.2.3.	Einfluß der kontinuierlichen Vorbehandlung mit verschiedenen Hormonen auf die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier	79
3.2.3.1.	Einfluß der Vorbehandlung mit Insulin	80
3.2.3.2.	Einfluß der Vorbehandlung mit Dexamethason und Glucagon	84
3.2.4.	Einfluß sequentieller Hormonvorbehandlung auf die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten von gehungerter Ratte	95
3.2.4.1.	Umsetzen von Dexamethason auf Kontrollbedingungen	96
3.2.4.2.	Umsetzen auf Gluconeogenese-stabilisierende Hormonbedingungen	99
3.2.4.2.1.	Umsetzen auf Dexamethason	99
3.2.4.2.2.	Umsetzen auf Dexamethason/Glucagon	102
3.2.4.2.3.	Umsetzen auf Insulin/Dexamethason/Glucagon	104
3.3.	Glucose-6-Phosphatase	108
3.3.1.	Biochemische Messungen	108
3.3.1.1.	Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in W/AB-77-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten	108
3.3.1.2.	Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in L15-Medium	112
3.3.1.3.	Einfluß von Medienkomponenten	116
3.3.1.3.1.	Veränderung der Zusammensetzung des W/AB-77-Mediums	116

Seite

3.3.1.3.2. Veränderung der Zusammensetzung des L15-Mediums 118

3.3.1.4. Lichtmikroskopische Beobachtungen 121

3.3.1.5. Einfluß der sequentiellen Kultivierung in W/AB-77- und L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten 123

3.3.1.6. Einfluß der Medienglucose auf die G6Pase-Aktivität 126

3.3.1.6.1. Glucose-Einfluß in L15-Medium 126

3.3.1.6.2. Glucose-Einfluß in W/AB-77-Medium 128

3.3.2. Zytochemische Lokalisierung der G6Pase in der Hepatozyten-Monolayer 130

4. DISKUSSION 135

4.1. Glykogen 135

4.2. Gluconeogenese 138

4.2.1. Einfluß der Inkubationsbedingungen auf Harnstoffsynthese und Glucosebilanz 138

4.2.2. Einfluß der Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die Gluconeogenese-Kapazität 142

4.3. Glucose-6-Phosphatase 149

4.3.1. Biochemische Messungen 149

4.3.2. Zytochemische Lokalisierung 154

5. ZUSAMMENFASSUNG 158

6. LITERATURVERZEICHNIS 163

Abkürzungen

Dex:	Dexamethason (9α-Fluor-16α-Methyl-Prednisolon)
DTG:	Dexamethason/Trijodthyronin/Glucagon
EDTA:	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA:	Äthylenglykol-bis-(β-Aminoäthyläther)N,N'-Tetraessigsäure
rER:	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
sER:	glattes Endoplasmatisches Retikulum
Gluca:	Glucagon
G6Pase:	Glucose-6-Phosphatase
G6PDH:	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES:	4-(2-Hydroxyäthyl)-1-Piperazin-äthansulfonsäure
Ins:	Insulin
Kakodylat:	Dimethylarsinsäure-Natriumsalz
L15:	Leibovitz's Medium L-15
ODC:	Ornithin-Decarboxylase
PEPCK:	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
RSA:	Rinderserumalbumin
T3:	Trijodthyronin
W/AB-77:	modifiziertes Waymouth's Medium, nach Gebhardt (47)

1. EINLEITUNG

1.1. Primärkulturen von Hepatozyten als experimentelles System

Die Verwendung von Hepatozyten-Primärkulturen als in vitro-System zur Untersuchung spezifischer Leberfunktionen und deren Regulation hat seit etwa einem Jahrzehnt zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Voraussetzungen hierfür waren gegeben, nachdem es gelungen war, große Mengen intakter Parenchymzellen selektiv zu isolieren (9) und unter geeigneten Kulturbedingungen über mehrere Tage in einem vitalen und funktionstüchtigen Zustande zu erhalten (10,16,17) (maintenance culture). Dieses System erscheint in besonderem Maße dazu geeignet, Untersuchungen von längerfristigen Vorgängen im Leberstoffwechsel am isolierten, weniger komplexen Modell unter definierten Bedingungen durchführen zu können; hierfür reicht die "Überlebenszeit" anderer etablierter in vitro-Systeme der Leber, wie Leberschnitte, isoliert perfundierte Leber und frisch isolierte Hepatozyten, häufig nicht aus, wie z.B. im Falle der Induktion von Enzymen mit längeren Halbwertszeiten. Gegenüber der Verwendung von frisch isolierten Hepatozyten hat sich die Primärkultur auch insofern als vorteilhaft erwiesen, als sie den Zellen eine Erholung von Beeinträchtigungen ermöglicht, die sie während der Isolationsprozedur erfahren: als Beispiel seien hier nur erwähnt die Normalisierung verringerter ATP-Spiegel (10), die Zunahme der Hormonantwort auf Insulin und Glucagon (70), die Induzierbarkeit von Enzymen wie TAT (149), ODC (108,114) oder G6PDH (108) und des Aminosäuretransports (85) sowie der Übergang aus einem proteinkatabolen (29,136) in einen anabolen Zustand (70,136).

Als wichtige Voraussetzung im Hinblick auf die Verwendbarkeit von Primärkulturen für längerfristige Untersuchungen leberspezifischer Funktionen müssen die spezifischen Eigen-

schaften der Hepatozyten, die zu Beginn der Kultivierung denen in vivo qualitativ und quantitativ weitgehend entsprechen, in der Primärkultur über längere Zeit aufrechterhalten werden können.

Untersuchungen in verschiedenen Bereichen des Leberstoffwechsels haben ergeben, daß die Zellen in der Primärkultur unter Bedingungen, die zum Überleben der Zellen geeignet sind (maintenance culture), mit zunehmender Kulturdauer einen mehr oder weniger stark ausgeprägten spontanen Verlust leberspezifischer Eigenschaften zeigen. Da dieser Rückgang in Abwesenheit von mitotischer Aktivität und bei relativer Konstanz der Zellzahl stattfindet, kann er nicht mit Veränderungen in der Zellpopulation, etwa über eine Zunahme des Anteils proliferierender, dedifferenzierter Zellen oder einen Verlust weniger anpassungsfähiger, differenzierter Hepatozyten erklärt werden. Der Verlust leberspezifischer Eigenschaften geht auch nicht mit einer allgemeinen Verschlechterung der Vitalität einher, wie sich z.B. anhand der fehlenden Anfärbung mit Vitalfarbstoffen oder dem in den ersten Kulturtagen eher zunehmenden Einbau von Aminosäuren in zelluläres Protein (44,70) nachweisen läßt. Es handelt sich hierbei offenbar um eine phänotypische Adaptation (11) an die in vitro-Bedingungen, die eine koordinierte metabolische Antwort auf veränderte Anforderungen und fehlende Stimuli darstellt. Sie könnte Teil eines Übergangs zu völlig adaptierten, zur Proliferation fähigen Zellen und damit vom adulten zum fötalen Zustand sein. Diese Interpretation wird gestützt durch das Auftreten von α-Fötoprotein (92,139) und fötaler Isoenzyme (38) sowie die allgemeine Umstellung in Richtung auf Anaerobiose, die sich in der Zunahme glykolytischer Enzyme bei gleichzeitigem Verlust an Enzymen der Atmungskette (108) ausdrücken.

Im Hinblick auf die Verwendbarkeit der Primärkulturen zur Untersuchung leberspezifischer Eigenschaften ist nach den vorangegangenen Feststellungen entscheidend, inwieweit es gelingt, den Verlust an spezifischen Leistungen durch die

Wahl geeigneter Kulturbedingungen, wie einer angepaßten Medienzusammensetzung oder der Verwendung spezifischer Substrata (11,119), gering zu halten oder gegebenenfalls rückgängig zu machen. Die Frage, auf welche Weise und in welchem Ausmaß dies erreicht werden kann, muß für die jeweils zu untersuchende Eigenschaft separat beantwortet werden, da sich gleiche in vitro-Bedingungen auf verschiedene leberspezifische Leistungen unterschiedlich auswirken können.

Die Umgebung der Hepatozyten in vivo ist ungewöhnlich komplex: an der lateralen Seite stehen sie mit benachbarten Parenchymzellen und im kanalikulären Membranbereich mit der Gallenflüssigkeit in engem Kontakt, an der Sinusoidalseite besteht eine unmittelbare Nachbarschaft zu Nichtparenchymzellen, vor allem Endothelzellen und Kupfferschen Sternzellen. Ein noch höherer Grad der Komplexität entsteht in vivo durch das Vorliegen einer Zonierung innerhalb der funktionellen Lebereinheit, des Azinus (117,118): In Abhängigkeit von ihrer Lage innerhalb des Azinus, die mit einer unterschiedlichen Mikroumgebung im Hinblick auf O_2-, Substrat- und Hormonkonzentrationen verbunden ist, besitzen die Hepatozyten in vivo unterschiedliche metabolische Eigenschaften (73,117). Diese komplexe und für die Aktivität in vivo offensichtlich bedeutsame (s. "metabolische Zonierung") dreidimensionale Anordnung wird bei der Zellisolierung aufgelöst und im Rahmen der Ausbildung der Monolayer zu einer zweidimensionalen Anordnung der weitgehend von Nichtparenchymzellen abgetrennten Hepatozytenpopulation verändert, wobei alle Zellen der Monolayer identischen Kulturbedingungen ausgesetzt sind. Aufgrund dieser intrinsischen Unterschiede zwischen der Situation in vivo bzw. in vitro, insbesondere der komplexen intraazinären Mikroumgebung in vivo, ist nicht zu erwarten, daß es gelingt, alle leberspezifischen Eigenschaften zur gleichen Zeit in der Primärkultur auf hohem Niveau aufrechterhalten zu können; stattdessen wird es nötig sein, die Medienbedingungen für die jeweilige Funktion zu optimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel der leberspezifischen Funktionen Harnstoffsynthese, Glykogenmetabolismus und Gluconeogenese näher untersucht, wie sich diese spezifischen Leistungen unter verschiedenen Medienbedingungen beeinflussen lassen, insbesondere im Blick auf die Möglichkeit, diese in der Primärkultur über mehrere Tage auf hohem Niveau aufrechtzuerhalten. Am Beispiel der Glucose-6-Phosphatase wurde neben dem Hormon- und Substrateinfluß auf die enzymatische Aktivität mittels zytochemischer Lokalisierung die Verteilung der Enzymaktivität innerhalb der Monolayer untersucht. Hierbei sollte vor allem geprüft werden, ob die in vivo beobachtete Heterogenität der Hepatozyten unter den Kulturbedingungen aufgehoben wird oder erhalten bleibt. Aus den Ergebnissen lassen sich neue Aussagen über die längerfristige hormonelle Regulation dieser Stoffwechselprozesse ableiten.

1.2. Glykogenstoffwechsel

Der Glykogenstoffwechsel bildet zusammen mit der Gluconeogenese die Grundlage für die homöostatische Rolle der Leber, d.h. für ihre Fähigkeit, den Blutglucosespiegel innerhalb eines relativ engen Konzentrationsbereiches konstant zu halten. Dabei kommt dem Glykogen als Glucosespeicher eine besondere Bedeutung zu. Die Reservefunktion besteht darin, daß die während der absorptiven Phase aufgefüllten Glykogenspeicher in der postabsorptiven Phase mobilisiert und in Form von Glucose an das Blut abgegeben werden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Substratzufuhr aus dem Intestinalbereich gering und die hepatische Gluconeogenese alleine nicht ausreichend, den Glucosespiegel im Blut konstant zu halten (121). Die Speicherung des Glykogens erfolgt also nicht, wie etwa im Muskel, für den Eigenbedarf des Organs, sondern vorwiegend als Reserve zur Versorgung glucoseabhängiger peripherer Zellen und Gewebe, vor allem der Erythro-

zyten, des Zentralnervensystems und Nebennierenmarks, aber auch des Fett- und Muskelgewebes (121). Da die Leber ihren Energiebedarf in erster Linie über die Metabolisierung von Fettsäuren deckt (88), wird nur ein geringer Teil des hepatischen Glykogens zu Lactat oder CO_2 abgebaut; andererseits stellt Glykogen eine gegenüber freier Glucose bevorzugte Quelle für die hepatische Fettsäuresynthese dar (14, 28).

Zur Anpassung des Glykogenstoffwechsels an die Anforderungen der Glucosehomöostase unterliegen Synthese und Abbau einer effektiven Kontrolle. An dieser Regulation ist neben Hormonen (60) und autonomem Nervensystem (138) in besonderem Maße der Blutglucosespiegel selbst direkt beteiligt, woraus sich ein grundlegender autoregulatorischer Charakter dieser Kontrolle ergibt (146).

Von den am Glykogenstoffwechsel beteiligten Hormonen sind Insulin und Glucocorticoide als glykogene Effektoren, Glucagon und Katecholamine als glykogenolytische besonders bedeutsam. Das autonome Nervensystem vermag mittels adrenerger Stimulation (N. splanchnicus) die Glykogenolyse, mittels cholinerger (N. vagus) die Glykogensynthese zu erhöhen (138). Während die glykogenolytischen Hormone schnell wirken und deshalb eine angepaßte Reaktion auf einen momentan auftretenden erhöhten Glucosebedarf, etwa in Streßsituationen, ermöglichen, scheinen Insulin und Glucocorticoide keine akuten Wirkungen auf die Glykogensynthese auszuüben. Ein adäquater Hormonstatus dieser Hormone in vivo ist jedoch für die Aufrechterhaltung der Stimulierbarkeit der Glycogensynthese durch Glucose von entscheidender Bedeutung, wie Untersuchungen an gefütterten diabetischen (106, 157) und gehungerten adrenalektomierten Tieren (15,159) gezeigt haben: In beiden Fällen fehlt die Stimulierbarkeit der Synthese und kann durch entsprechende Hormonvorbehandlung wiederhergestellt werden.

Die autoregulatorische Bedeutung der Blutglucose - insbesondere das Vorhandensein einer Schwellenkonzentration, bei

der die Leber von der Glucosefreisetzung zur Glucoseaufnahme und Glykogensynthese übergeht, wurde schon früh erkannt (141,142). Die enzymatischen Grundlagen dieses leberspezifischen Regulationsmechanismus wurden jedoch erst in jüngerer Zeit ermittelt (s. Übersichtsartikel 62,146). Glucose wirkt, unabhängig von ihrer Eigenschaft als Substrat der Glykogensynthese, auf der Ebene der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Glykogenstoffwechsels direkt ein und bewirkt mit zunehmender Konzentration eine Verminderung der Glykogenolyse und ab einem Schwellenwert eine zunehmende Stimulation der Glykogensynthese. Diese Beobachtungen konnten auf der molekularen Ebene durch die Umwandlung der aktiven "a"-Form der Phosphorylase (49), des limitierenden Enzyms der Glykogenolyse, in die in vivo praktisch inaktive "b"-Form als Folge der glucoseabhängigen Aktivierung der Phosphorylase-Phosphatase erklärt werden. Diese Inaktivierung durch Dephosphorylierung führt in Anwesenheit von Glucosewerten unterhalb der Schwellenkonzentration zu einer verminderten Glykogenolyse. Dem Schwellenwert der Glucose entspricht eine Schwellenaktivität der Phosphorylase a, die bei ca. 10 % der Gesamtaktivität (a + b) liegt. Wird die Phosphorylase a durch erhöhte Glucosekonzentrationen unter diesen Wert abgesenkt, so wird die starke Hemmung, welche die Phosphorylase a auf die Glykogensynthase-Phosphatase, das aktivierende Enzym der Glykogensynthase, ausübt, aufgehoben (62,146). Daher kommt es in Anwesenheit von Glucosewerten, die über der Schwellenkonzentration liegen, zu einem Anstieg der Glykogensynthase-Aktivität und damit der Glykogensynthese, der zur Restaktivität der Phosphorylase a umgekehrt proportional ist. Die zuvor beschriebene Reaktionssequenz konnte in vivo (145) und in vitro (33) als Grundlage für die glucoseabhängige Stimulation der Glykogensynthese nachgewiesen werden. Dieser Regulationsmechanismus führt in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen zu einem verstärkten Glucoseeinbau in Glykogen, der von der aktuellen Anwesenheit von Hormonen unabhängig ist (158). Daß der glykogene Effekt der Glucose

von ihrer Eigenschaft als Substrat unabhängig ist, wird in Anwesenheit gluconeogenetischer Substrate besonders deutlich. Beim Hungertier führt das gleichzeitige Angebot von Glucose und gluconeogenetischen Substraten zu einer gegenüber den einzelnen Substraten deutlich erhöhten Glykogensynthese, die auf einem bevorzugten Einbau von Glykosyleinheiten aus der Gluconeogenese beruht (59), während der Anteil der externen Glucose trotz hoher Konzentration nur gering ist; externe Glucose wirkt hier als Signal, wodurch in der Gluconeogenese gebildetes Hexosephosphat von der Freisetzung als Glucose in Richtung Glykogensynthese umdirigiert wird.

Eine stimulierende Wirkung auf die Glykogensynthese, die unabhängig von ihrer Eigenschaft als Substrat ist, wurde auch für Galactose (160), Fructose (79) und Aminosäuren, insbesondere Glutamin (77), beschrieben.

1.3. Harnstoffsynthese

Die Harnstoffsynthese aus Ammoniak und Aminosäuren ist eine spezifische Eigenschaft der Leberparenchymzellen. Ihre physiologische Bedeutung liegt einerseits in der Entgiftung freien Ammoniaks, der in größeren Mengen über das Pfortaderblut in die Leber gelangt und sich aus einem exogenen, dem Stoffwechsel der Darmbakterien entstammenden, sowie einem endogenen, beim Glutaminabbau in der Darmwand (98a) entstehenden Anteil zusammensetzt; gleichzeitig spielt die Harnstoffsynthese eine entscheidende Rolle beim Entfernen überschüssigen Reststickstoffs im Rahmen einer ausgeglichenen Stickstoffbilanz des Gesamtorganismus.

Bei isolierten und kultivierten Hepatozyten kann der Nachweis einer aktiven Harnstoffsynthese als komplexes Vitalitätskriterium dienen, da zu ihrem Funktionieren ein koordiniertes Zusammenwirken verschiedener Zellkompartimente er-

forderlich ist. Neben dem Zytosol, wo drei der vier Reaktionen des Zyklus ablaufen, sind die Mitochondrien beteiligt, in denen neben der Zyklusreaktion der Citrullinsynthese auch die energieaufwendige Synthese des Carbamylphosphats stattfindet. Diese Organellen sind am Funktionieren des Harnstoffzyklus auch dadurch entscheidend beteiligt, daß sie den Carrier-abhängigen Transport der Zyklusintermediate Ornithin und Citrullin sowie der als Überträger dienenden Substrate Glutamat, Aspartat und Malat gewährleisten.

Neben der Bedeutung als Kriterium für die metabolische Intaktheit kann das Vorhandensein einer aktiven Harnstoffsynthese und ihre Beeinflußbarkeit durch physiologische Faktoren auch als Kriterium für den Differenzierungsgrad längerfristig kultivierter Hepatozyten dienen.

Eine kurze Zusammenfassung von in vivo- und in vitro-Ergebnissen zur Kurz- und Langzeitregulation der Harnstoffsynthese, insbesondere der einzelnen Enzyme des Harnstoffzyklus, findet sich in der Dissertation von Gebhardt (47). Hier sowie an anderer Stelle (45,46) sind auch Ergebnisse von Untersuchungen zur Regulation der einzelnen Harnstoffzyklusenzyme durch Hormone und Substrate in der Hepatozyten-Primärkultur dargestellt, insbesondere als Gegenüberstellung der Kultursysteme Perifusion und diskontinuierliche Kultivierung (46).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Harnstoffsynthese im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Gluconeogenese ermittelt. Das Ziel war, den kurzfristigen (Inkubationsbedingungen) und längerfristigen (Kulturbedingungen) Einfluß verschiedener Substrat- und Hormonbedingungen auf die Harnstoffsynthese der kultivierten Zellen zu untersuchen, insbesondere im Vergleich mit dem gleichzeitigen Einfluß dieser Bedingungen auf Glucosebildung und Lactatverbrauch.

1.4. Gluconeogenese

Im Säugerorganismus sind Leber und Niere die einzigen Organe, die zur Gluconeogenese und Abgabe freier Glucose an das Blut befähigt sind, da nur sie mit allen hierzu erforderlichen Schlüsselenzymen ausgestattet sind. Der Anteil der Niere an der gesamten Glucosebildung ist unter normalen physiologischen Bedingungen nur gering (< 20 %), er kann jedoch unter den Bedingungen der metabolischen Acidose, z.B. nach längerem Fasten, auf bis zu 50 % ansteigen (113); eine adaptive Zunahme der Gluconeogenese in der Niere wird auch beobachtet, wenn die hepatische Kapazität aufgrund von Leberschädigungen oder partieller Hepatektomie vermindert ist (81).

Die entscheidende Rolle, welche der Leber bei der Homöostase des Blutglucosespiegels zukommt, beruht vor allem auf dem koordinierten Zusammenwirken von Glykogenstoffwechsel und Gluconeogenese, die aufgrund ihrer hohen Kapazität und kurzen Reaktionszeiten größere Schwankungen der Glucosekonzentration im peripheren Blut zu verhindern vermögen. Die Kurzzeitregulation dieser beiden Stoffwechselwege erfolgt einerseits hormonell, vor allem über Glucagon (115) und die Transmitter des autonomen Nervensystems, Noradrenalin bzw. Acetylcholin (138), und andererseits über das Substrat Glucose selbst: Glucagon und Katecholamine bewirken über die gleichzeitige Stimulation von Glykogenolyse und Gluconeogenese (61) eine erhöhte Glucosefreisetzung, während Glucose autoregulatorisch wirkt, indem sie die Glykogensynthese stimuliert (s. Kap. 1.2.) und die Gluconeogenese hemmt (63).

Der Beitrag der hepatischen Gluconeogenese zur Glucoseversorgung des Gesamtorganismus ist im Hungerzustand, nach dem Entleeren der Glykogenspeicher, relativ am größten (121). In dieser Phase dienen vor allem Aminosäuren aus dem Proteinabbau im Muskelgewebe, die nach Metabolisierung in Muskel, Darm und Niere überwiegend in Form von Alanin und

Serin zur Leber gelangen (140), sowie in geringerem Maße Glycerin aus dem Fettabbau (24) als gluconeogenetische Substrate.

Ein hoher gluconeogenetischer Substratfluß in der Leber wird jedoch nicht nur unter den Bedingungen eines erhöhten Glucosebedarfs, sondern bereits in der absorptiven Phase beobachtet: gluconeogenetische Substrate wie Lactat, glucoplastische Aminosäuren und Fructose gelangen aus dem Intestinalbereich über die Pfortader in die Leber und werden in dieser Phase nach gluconeogenetischer Umwandlung bevorzugt in Glykogen eingebaut.

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für den Gesamtorganismus steht die Gluconeogenese seit einer Reihe von Jahren im Mittelpunkt experimenteller Studien und hat sich als Modellsystem für die Untersuchung hepatischer Kontrollmechanismen, insbesondere der Kurzzeitregulation durch Hormone, bewährt. Die Möglichkeit, die Leber intakt zu isolieren und in vitro längere Zeit funktionsfähig zu erhalten, erlaubt die Analyse von Stoffwechselvorgängen unter gegenüber in vivo-Bedingungen klarer definierten und leichter zu kontrollierenden Verhältnissen. Eine weitere Reduzierung der Komplexität des experimentellen Systems wurde möglich, als es gelang, von Nichtparenchymzellen weitgehend freie Suspensionen intakter und funktionsfähiger Hepatozyten zu isolieren (9). Auf der Basis dieser in vitro-Systeme konnte eine Reihe von Regulationsstellen ermittelt und charakterisiert werden, die für die akute Kontrolle der Gluconeogenese von Bedeutung sind. Aufgrund der relativ kurzen Lebensdauer (wenige Stunden) sind diese experimentellen Systeme jedoch für die Untersuchung längerdauernder Regulationsvorgänge, etwa auf der Basis von Enzyminduktionen, wenig geeignet. Als Möglichkeit, den experimentell zugänglichen Zeitraum zu verlängern, bietet sich die Verwendung kultivierter Hepatozyten an. Während sich von der Leber abgeleitete Zelllinien für die Untersuchung der Gluconeogenese als ungeeignet erwiesen haben, da sie diese differenzierte Leistung

nicht aufrechtzuerhalten vermögen, erscheint die Verwendung von Primärkulturen adulter Hepatozyten erfolgversprechend, wenn es gelingt, die differenzierte Eigenschaft durch geeignete Kulturbedingungen längere Zeit auf ausreichend hohem Niveau aufrechtzuerhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, in welcher Weise die Gluconeogenesekapazität der Hepatozyten in der Primärkultur durch unterschiedliche Hormonbehandlung beeinflußt wird, insbesondere unter dem Aspekt, wie sie über längere Zeit stabilisiert werden kann.

1.5. Glucose-6-Phosphatase

1.5.1. Lokalisierung und Eigenschaften

Die Glucose-6-Phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) wird beim Säuger in höheren, physiologisch bedeutsamen Aktivitäten nur in den gluconeogenetischen Organen Leber und Niere gefunden. Innerhalb der Leberzelle ist sie vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (ER, ca. 75-80 %), daneben in der Kern- (ca. 20 %) und Plasmamembran (ca. 5 %) als integrales Protein lokalisiert (72). Diese enge Membranassoziierung hat die Untersuchung der molekularen und kinetischen Eigenschaften des Enzyms erschwert. Im Zusammenhang mit der Beschreibung der Topologie in der Membran und zur Erklärung des Phänomens der Latenz, d.h. der Beeinflussung der kinetischen Eigenschaften der G6Pase durch in vitro-Behandlung der Membranen mit Detergentien (111), wurden zwei alternative Modelle entwickelt:

- Nach dem Konformationsmodell von Stetten & Burnett (147) und Nordlie et al. (54,110) überspannt die G6Pase als integrales Protein die gesamte Membran; durch nicht genauer bekannte Veränderungen in der Lipidumgebung wird über Konformationsänderungen die Bindung von Substrat auf der zy-

toplasmatischen Seite und die Freisetzung der Produkte auf der luminalen Seite des ERs ermöglicht.

- Die Substrat-Transport-Hypothese nach Arion et al. (2) postuliert ein Zwei-Komponentensystem: ein Glucose-6-Phosphat-spezifischer, geschwindigkeitsbestimmender Transporter gewährleistet den Substrattransport über die Membran in das Lumen des ERs, wo eine an der luminalen Oberfläche lokalisierte unspezifische Phosphatase die Spaltung vollzieht. Untersuchungen mittels Antikörpern, kontrollierter Proteolyse, Temperaturstudien und Phospholipidmodifikationen (131) stützen ein modifiziertes Transportmodell, wonach die G6Pase in situ von keiner der beiden Seiten der Membran direkt zugänglich ist, und die Phospholipidumgebung, insbesondere Phosphatidylethanolamin, direkt am Transportprozeß beteiligt ist.

Im Hinblick auf die hormonelle Regulation der G6Pase wurden bis vor kurzem keine Effekte beschrieben, die über direkte Enzymmodifikationen zu schnellen Aktivitätsänderungen führen könnten; allgemein wurde davon ausgegangen, daß die Regulation der Enzymaktivität nur über die Substratkonzentration (K_m: 2,6 mM) und über längerfristige Änderungen der Enzymmenge stattfindet (69,76). Neuere Befunde scheinen aber auf die Möglichkeit einer direkten Stimulierung der G6Pase-Aktivität mittels cAMP-unabhängiger Phosphorylierung hinzudeuten (5).

Untersuchungen an fötalen Ratten zeigten, daß die G6Pase erst kurz vor der Geburt in der Leber nachweisbar ist und nach der Geburt stark ansteigt (19). Durch Gabe von Glucagon, Adrenalin oder cAMP kann in der Leber (nicht in der Niere) des Fötus in utero ein vorzeitiges Auftreten von adulten G6Pase-Werten induziert werden; nach Greengard soll dabei die Umwandlung aus einer inaktiven Vorstufe stattfinden (52). Wegen des dramatischen Aktivitätsanstiegs im Bereich des Geburtstermins wurde das Enzym als Marker in Studien über die Biogenese des Endoplasmatischen Retikulums in der Leber der embryonalen und neugeborenen Ratte verwendet

(30,31,94,95); hierbei wurde gefunden, daß aktives Enzym in allen Membranen des rauhen ERs einer Zelle gleichzeitig und gleichmäßig verteilt, in verschiedenen Zellen jedoch asynchron, auftritt (94,95).

Histochemische (123,132) und nach Mikrodissektion ermittelte biochemische Daten (80) zeigen, daß die G6Pase in der adulten Ratte innerhalb des Leberazinus heterogen verteilt ist: periportale, d.h. in der Zone 1 nach Rappaport (117) um die terminalen afferenten Gefäße lokalisierte Zellen zeigen im allgemeinen eine höhere Aktivität als perivenöse, in Zone 3 gelegene Zellen. Diese Zonierung ist dynamisch, d.h. die Verteilung der Aktivität innerhalb des Azinus kann sich unter bestimmten physiologischen Bedingungen ändern: Histochemische Untersuchungen an der normal gefütterten Ratte zeigten, daß G6Pase-reiche Zellen ca. 40-60 % des Parenchyms umfassen (123,132); dieser Anteil erhöht sich nach 24-stündigem Hungern auf 75-85 % (123), da nun auch die Zonen 2 und 3 eine erhöhte G6Pase-Aktivität zeigen. Wie biochemische Messungen an mikrodisseziertem Material gezeigt haben (80), nimmt hierbei das Ausmaß der inhomogenen Verteilung innerhalb des Azinus ab, da der Anstieg der G6-Pase-Aktivität im periportalen Bereich vergleichsweise geringer ist als im perivenösen.

Nach partieller Hepatektomie verschiebt sich die G6Pase-reiche Zone aus dem periportalen Bereich, der unter diesen Bedingungen Hauptort der Zellproliferation ist, in den intermediären bis perivenösen Bereich (21).

Die heterogene Verteilung der G6Pase innerhalb des Azinus wird in gefütterten und gehungerten Ratten durch die Gabe von Phenobarbital oder ähnlichen Substanzen verstärkt, die eine selektive Proliferation des ERs in der perivenösen Zone induzieren: aus der starken Zunahme der ER-Membranen ohne entsprechende Steigerung der Synthese von G6Pase resultiert eine relative Abnahme der Aktivität in diesen Zellen; im ultrahistochemischen Bild zeigt sich in den perivenösen Hepatozyten entlang der proliferierenden Membranen ein Aus-

einanderrücken enzympositiver Stellen (101), während in periportal lokalisierten Zellen eine gleichmäßige Verteilung der Aktivität über dem ER gefunden wird, welche bei unbehandelten Tieren für beide Zonen typisch ist (101).

Im Verlauf der experimentellen Hepatokarzinogenese treten als vermutliche Vorstufen der Tumoren präneoplastische Foci, später hyperplastische Knötchen auf (124), die sich vom umliegenden Gewebe unter anderem durch ihre geringe G6Pase-Aktivität unterscheiden; auch hier wurde eine unregelmäßige Verteilung der G6Pase im ER gefunden (8,154). Die Abnahme der Enzymaktivität ist Ausdruck eines Verlustes an spezialisierten Hepatozyten-Funktionen, wie Ergebnisse an Zelllinien zeigen, die von Hepatomen oder Hepatozyten-Primärkulturen abgeleitet waren: in allen Fällen wurde ein weitgehender Verlust der G6Pase-Aktivität beobachtet (53).

1.5.2. Die physiologische Bedeutung der G6Pase

Die Glucose-6-Phosphatase zählt neben Pyruvat-Carboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Fructose-1,6-Bisphosphatase zu den Schlüsselenzymen der Gluconeogenese. Das Substrat G6P nimmt eine zentrale Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel ein, da es einen Kreuzungspunkt mehrerer Stoffwechselwege darstellt: neben seiner Umsetzung durch die G6Pase, der terminalen Reaktion von Gluconeogenese und Glykogenolyse, ist es gleichzeitig Substrat von Glykolyse, Glykogensynthese und Pentosephosphatzyklus.

Von besonderer Bedeutung für den gesamten Glucosestoffwechsel in der Leberzelle scheint die Möglichkeit der Ausbildung eines "futile cycle" zwischen Glucose und G6P zu sein: wegen der erleichterten Diffusion von Glucose in die Leberzelle und der gleichzeitigen Anwesenheit von mikrosomaler G6Pase und leberspezifischer, zytoplasmatischer Glucokinase ist ein ständiges Zyklisieren der Glucose zwischen phospho-

ryliertem und dephosphoryliertem Zustand zu erwarten; dies würde in der Summe einen "sinnlosen" ATP-Verbrauch ergeben. Untersuchungen in vivo und in vitro haben das Funktionieren eines solchen Zyklus bestätigt; dieser ist im gefütterten Zustand nach kohlenhydratreicher Diät besonders ausgeprägt, aber auch im Hungerzustand nicht vernachlässigbar (18). Nach Berechnungen von Katz et al. (76) betragen die Energiekosten des Glucose-G6P-Zyklus in diesem Falle noch ca. 5 % des gesamten gebildeten ATP's der Hepatozyten. Daß der Glucose-Zyklus keinen sinnlosen Energieverlust bedeutet, sondern im Zusammenhang mit der gluco-homöostatischen Rolle der Leber einen regulatorischen "Sinn" erhält, wurde bereits 1959 von Cahill et al. (23) diskutiert: als Resultat gegensätzlicher Änderungen der Aktivitäten der beiden beteiligten Enzyme sollte eine Veränderung des metabolischen Flusses in die eine oder andere Richtung möglich sein. Diese Vorstellungen konnten allerdings keine zufriedenstellende Erklärung für die schnellen Änderungen in der Netto-Aufnahme bzw. Freisetzung von Glucose geben, wie sie bereits sehr kurze Zeit nach hohen Glucosegaben bzw. nach Applikation von glykogenolytischen Hormonen wie Glucagon oder Adrenalin auftreten, ohne daß hierbei stabile Änderungen in den Aktivitäten von Glucokinase bzw. G6Pase zu beobachten sind. Hue und Hers (67) konnten zeigen, daß der Glucose-G6P-Zyklus aufgrund der kinetischen Eigenschaften der beteiligten Enzyme und im Zusammenwirken mit Stoffwechselwegen, die von G6P ausgehen, autoregulatorische Eigenschaften besitzt, d.h. die Netto-Aufnahme unter hohen externen Glucosekonzentrationen bzw. Netto-Abgabe bei niedrigen externen Glucosekonzentrationen ermöglicht; der Äquivalenzpunkt (Netto-Flux = 0) wurde bei 1 mg Glucose/ml errechnet (67), was der physiologischen Plasmakonzentration entspricht. Die autoregulatorische Eigenschaft kommt dadurch zustande, daß es sich bei G6Pase und Glucokinase um Enzyme hoher Kapazität (V_{max}) mit hohem K_m (ca. 2 mM (72,111) bzw. ca. 10 mM (69)) handelt, der im Falle der Glucokinase im Bereich der Glucosekonzentrationen im Pfortaderblut, im Falle der G6Pase je-

doch ca. 10-fach höher als die intrazelluläre G6P-Konzentration (0,15 - 0,2 mM (67)) liegt; daher ist die Aktivität der Glucokinase von Änderungen des Substratspiegels mäßig (ca. 50 % bei Verdopplung), die der G6Pase jedoch annähernd linear von der Konzentration des G6P's und dessen Veränderung unter verschiedenen physiologischen Bedingungen abhängig. Solche Veränderungen der steady-state-Konzentrationen des G6Ps entstehen durch "pull"- bzw. "push"-Effekte aus den von G6P ausgehenden Stoffwechselwegen (69): unter hohen extrazellulären Glucosekonzentrationen oder glykogenolytischen Bedingungen, z.B. nach Gabe von Glucagon oder Adrenalin, kommt es zu einem Anstieg, bei Aktivierung der Glykogensynthese, z.B. nach Gabe von Glucose, die zur Aktivierung der Glykogensynthase führt (32), oder bei gesteigertem Pentosephosphatzyklus zu einer Abnahme der G6P-Konzentration.

Insgesamt ergibt sich damit aufgrund der kinetischen Eigenschaften der beiden Enzyme des Glucose/G6P-Zyklus und der Lage an einer Verzweigungsstelle des Kohlenhydratstoffwechsels für die Leberzelle die Fähigkeit, sich durch schnelle und große Änderungen im Netto-Flux in die eine oder andere Richtung den metabolischen Erfordernissen anzupassen, ohne spezielle Mechanismen des An- bzw. Abschaltens von Glucokinase und G6Pase zu benötigen. In diesem Zusammenhang ist die inverse Zonierung von G6Pase (periportal > perivenös) und Glucokinase (perivenös > periportal) von besonderer Bedeutung: Auf der Basis der bekannten K_m-Werte, der mittels Mikrodissektion in der periportalen bzw. perivenösen Zone ermittelten Enzymaktivitäten und G6P-Spiegel, sowie der portalen und venösen Glucosekonzentrationen errechneten Jungermann et al. (74), daß die periportale Zone während des normalen Fütterungszyklus durchgehend eine Netto-Glucoseabgabe, die perivenöse Zone jedoch gleichzeitig eine Netto-Glucoseaufnahme zeigt und nur im Hungerzustand zur Netto-Glucosefreisetzung übergeht.

Neben der Kurzzeitregulation über das Substratangebot wird die G6Pase-Aktivität in ähnlicher Weise wie die übrigen

Schlüsselenzyme der Gluconeogenese durch Hormone wie Glucagon, Glucocorticoide, Schilddrüsenhormone und Insulin längerfristig beeinflußt; es handelt sich hierbei um die Zunahme (Glucagon, T3) bzw. Abnahme (Insulin) der Enzymmenge, im Falle der Glucocorticoidwirkung wurde von Proctor und Nordlie (116) eine Aktivierung vorhandenen Enzyms über eine verminderte Latenz postuliert.

Inwieweit in jüngster Zeit publizierte Befunde, wie eine in vitro beobachtete Aktivierung der G6Pase durch cAMP-unabhängige Phosphorylierung von Mikrosomenpräparationen (5) und die ebenfalls an isolierten Membranfraktionen beobachtete kurzfristige Beeinflußbarkeit der Latenz der Enzymaktivität durch Hormone (144), wie Insulin (latenzverstärkend) bzw. Glucagon und Glucocorticoide (die Latenz verringernd), physiologisch von Bedeutung sind, erscheint zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der G6Pase in Primärkulturen adulter Hepatozyten von gefütterten Ratten während mehrtägiger Kultivierung im Hinblick auf die Regulation durch Hormone wie Glucagon, Dexamethason, Trijodthyronin und Insulin untersucht. Da im Laufe dieser Untersuchungen ein entscheidender Einfluß der verwendeten Basalmedien (W/AB-77 bzw. L15) auf die G6Pase-Aktivität und deren hormonelle Beeinflußbarkeit beobachtet wurde, wurde versucht, durch systematische Veränderungen der Medien die für den Unterschied verantwortliche(n) Komponente(n) zu identifizieren. Außerdem wurde der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen im Kulturmedium auf die Aktivität dieses wichtigen Enzyms der Gluconeogenese untersucht.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde mit zytochemischer Methode ein direkter Einblick in die Verteilung der G6Pase-Aktivität innerhalb der Hepatozyten-Monolayer gewonnen und deren Veränderung im Laufe einer mehrtägigen Kultivierung unter verschiedenen Medienbedingungen verfolgt.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Für die Gewinnung der Hepatozyten wurden nur männliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Körpergewicht von 250 - 300 g verwendet. Die Tiere wurden von der Tierzuchtanstalt Tuttlingen geliefert oder stammten aus hauseigener Weiterzucht. Gefütterte Tiere erhielten Alma^{R}-Futter (Botzenhardt, Kempten) und Wasser ad libitum; gehungerte Tiere wurden ca. 20 h ohne Futter gehalten.

2.2. Geräte

Sonifier B-12	Branson Sonic Power Corp. (Danbury, USA)
Autoklav FO/3-Z1	Fedegari (Padua, Italien)
CO_2-Brutschrank	Heraeus (Osterode)
Sterile Werkbank "Laminar Air Flow" (Horizontalstrom)	Centronic (Berlin)
Sterile Werkbank (Vertikalstrom)	Ceag (Bork)
Membranfiltrationsgerät SM 11307	Sartorius (Göttingen)
Durchlichtmikroskop "Ortholux"	Leitz (Wetzlar)
Inverses Mikroskop "Diavert"	Leitz (Wetzlar)
Einstrahlphotometer PM4	Zeiss (Oberkochen)
Zweistrahlphotometer Shimadzu UV140	Shimadzu Seisakusho (Japan)

Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Labofuge III	Heraeus-Christ (Osterode)

2.3. Verbrauchsmittel

2.3.1. Materialien

Plastik-Petrischalen (vierfach unterteilt)	Falcon (München)
Plastik-Petrischalen	Greiner (Nürtingen)
Polyamid-Maschengewebe (100, 200, 150 µm)	Seidengazefabrik Eckert (Waldkirch)
Membranfilter Typ SM 11307, 0,2 µm)	Sartorius (Göttingen)
Membranfilter Typ BA 83, 0,2 µm Typ BA 90/20, 0,6 µm	Schleicher & Schüll (Dassel)
Silikonschläuche	Wacker (München)
Filmmaterial: Kodak Plus-X pan, 22 DIN	Eastman Kodak Comp. (Rochester, New York)

2.3.2. Chemikalien, Enzyme, Hormone

Collagenase Typ I	Sigma (München)
Dexamethason	"
Glucagon	"
Insulin	"
Trijodthyronin (T3)	"
Rinderserumalbumin, reinst	Behring-Werke (Marburg)

Rinderserumalbumin, reinst, Fraktion V	Roth (Karlsruhe)
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	Serva (Heidelberg)
L15-Medium	Flow-Laboratories (Bonn)
Kälberserum	Serva (Heidelberg) und Paesel (Frankfurt)
Trypanblau	Flow-Laboratories (Bonn)
Glucoseoxidase, Typ VII	Sigma (München)
Peroxidase, Typ II	"
ABTS^{R}	"
Glutardialdehyd, speziell gereinigt	"

Alle weiteren Chemikalien waren analysenreine Produkte der Firmen Boehringer (Mannheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

2.4. Lösungen und Kulturmedien

2.4.1. Lösungen für die Zellisolation

Für die Isolierung der Hepatozyten wurden drei verschiedene Lösungen verwendet: Präperfusionsmedium (PPM), Perfusionsmedium (PM) und Isolationsmedium (IM). Diese drei Lösungen stellen Modifikationen der von Hanks (57) beschriebenen physiologischen Salzlösung dar, wobei die Zusammensetzung des PPM und PM weitgehend den Angaben von Ingebretsen und Wagle (71), die des IM weitgehend denen von Seglen (134) entsprach. Eine genaue Beschreibung der Zusammensetzung und Herstellung dieser Lösungen findet sich in der Dissertation von Metzler (102).

Der Grund für die Verwendung unterschiedlicher Medien liegt darin, daß PPM und PM ursprünglich als Bicarbonat-gepufferte, mit Carbogen begaste Lösungen eingesetzt wurden, während IM mit HEPES gepuffert und mit O_2 begast wurde, um eine gegenüber Bicarbonat/CO_2-Pufferung leichter zu erreichende pH-Konstanz während der eigentlichen Isolationsprozedur zu gewährleisten. Im Laufe dieser Arbeit wurde dazu übergegangen, auch PPM und PM mit 10 mM HEPES zu puffern.

2.4.2. W/AB-77-Medium

Für die Kultivierung von Hepatozyten in der Primärkultur wurde von Gebhardt (46,47) ein synthetisches Medium vorgeschlagen, das sich in seiner Zusammensetzung an Waymouth's MB 752/1 (156) orientiert, aufgrund einiger Modifikationen jedoch den Anforderungen kultivierter adulter Hepatozyten besser angepaßt ist. Die genaue Zusammensetzung dieses Mediums ist in (46,47,102) beschrieben, in (47) ist die Herstellung aus einzelnen, separat angesetzten Stammlösungen detailliert dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das W/AB-77-Medium in einer gegenüber (47) leicht veränderten Form (2 % Rinderserumalbumin, ohne Oleat und Pyruvat/Lactat) verwendet. Dieses synthetische Medium diente einerseits als Basis für die Herstellung des halbsynthetischen Vollmediums (s.u.) sowie andererseits als Waschmedium im Zusammenhang mit Inkubationen zur Gluconeogenese (s. 2.6.4.); im zweiten Fall wurde glucosefreies W/AB-77 verwendet, bei dem der $NaHCO_3$-Anteil durch NaCl ersetzt wurde, um pH-Konstanz während der Waschprozedur zu gewährleisten (W/AB-77 enthält 10 mM HEPES als Basispuffer).

2.4.3. Modifiziertes L15-Medium

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Medien auf die G6Pase-Aktivität wurde L15-Medium in modifizierter Zusammensetzung verwendet. Da L15 in der Originalzusammensetzung (93) kein Natriumbicarbonat enthält und daher nicht im CO_2-Brutschrank eingesetzt werden kann, wurde kommerzielles L15-Medium mit 25 mM Natriumbicarbonat supplementiert; gleichzeitig wurde Glucose supplementiert (5,5 mM; L15 enthält Galactose an Stelle von Glucose).

2.4.4. Halbsynthetisches Kulturmedium

Die Kultivierung und Inkubation der Hepatozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgehend in halbsynthetischem, 10 % Kälberserum enthaltendem Medium (W/AB-77 oder L15) durchgeführt. Das Ansetzen aus den Komponenten erfolgte im allgemeinen kurz vor dem Gebrauch; die wärmeempfindlichen Komponenten Glutamin (Endkonzentration 2 mM), Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 50 U bzw. 50 µg/ml) und Serum wurden bis zu diesem Zeitpunkt im Tiefkühlschrank gelagert. Die Supplementierung mit Hormonen und zusätzlichen Substraten erfolgte im allgemeinen durch Zugabe kleiner Volumina (ca. 1 - 2 %) entsprechender Stammlösungen während des Ansetzens der Medien.

2.4.5. Stammlösungen von Hormonen und Agenzien

Dexamethason

4 mg Dex wurden in 1 ml Äthanol gelöst und anschließend mit Hanks-Lösung auf 100 ml verdünnt. Bei der üblichen 1:100 Verdünnung dieser Stammlösung in Kulturmedium ergibt sich eine Konzentration von 10^{-6} M Dex und 1,7 mM EtOH. Die

Stammlösung ist unter sterilen Bedingungen bei $4^{o}C$ mindestens ein halbes Jahr haltbar.

Glucagon, Insulin

Diese Hormone wurden jeweils in möglichst wenig 0,1 N HCl aufgenommen (ca. 50 µl/mg) und mit Hanks-Lösung (Ins) bzw. aqua dest. (Gluca) verdünnt.
Die Konzentrationen in den Stammlösungen waren 0,1 mg/ml für Insulin (= $1{,}75 \times 10^{-5}$ M; 2,3 U/ml) und 0,35 mg/ml (10^{-4} M) für Glucagon; diese Lösungen wurden sterilfiltriert bei $4^{o}C$ gelagert und im allgemeinen innerhalb eines Monats aufgebraucht.

Trijodthyronin

T3 wurde in alkoholischer NaOH (0,2 M) gelöst und mit Hanks auf 10^{-3} M eingestellt (673 µg/ml); die Endkonzentration an EtOH im Kulturmedium beträgt bei 10^{-6} M T3 etwa 4,5 mM.
Die Stammlösung ist bei $4^{o}C$ etwa 1 Woche haltbar.

Trypanblau

Eine 0,5 %ige Lösung des Farbstoffs diente zur Vitalitätsbestimmung der isolierten Zellen. Die Lösung ist bei Zimmertemperatur nur unter sterilen Bedingungen sehr lange haltbar.

Nembutal

150 mg wurden in 5 ml H_2O gelöst und sterilfiltriert. Zur Narkotisierung der Ratten wurden 60 mg/kg Körpergewicht i.p. injiziert.

Pyruvat/Lactat

Eine Stammlösung mit 0,15 M/1,5 M Pyruvat/Lactat wurde durch Einwiegen von festem Natriumpyruvat in die neutralisierte Lösung von L-Milchsäure (30 %ige kommerzielle Lösung) hergestellt (5 ml: 2,25 g 30 %ige L-Milchsäurelösung + 0,8 ml

10 N NaOH + 82,5 mg Natriumpyruvat, ad 5 ml). Diese Lösung wurde sterilfiltriert, bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und jeweils unmittelbar vor der Zugabe zu den Zellen im Inkubationsmedium verdünnt. Die Stammlösung wurde für jede Kultur frisch angesetzt.

2.5. Isolierung der Leberparenchymzellen

Zur Isolierung der Hepatozyten wurde die Kollagenase-Perfusionsmethode nach Berry und Friend (9) in der Modifikation nach Ingebretsen und Wagle (71) angewandt. Die dabei verwendete Apparatur sowie die genaue Vorgehensweise wurde in meiner Diplomarbeit dargestellt (126). Kleinere, in jüngster Zeit eingeführte Modifikationen wurden von Metzler (102) näher beschrieben; deshalb sei der Präparationsgang hier nur kurz zusammengefaßt. Die Leber wurde unter kontinuierlichem Durchströmen mit Ca^{2+}-freiem, 0,2 mM EGTA-haltigem Präperfusionsmedium (ca. 0,8 l) isoliert und nach dem Einbringen in die Perfusionsapparatur mit Rinderserumalbumin-haltigem, sukzessive mit Kollagenase (20 - 40 mg pro 80 ml Endvolumen) und Ca^{2+} (Endkonzentration 2 mM) supplementiertem, begastem (CO_2 bzw. O_2, s. 2.4.1.) Perfusionsmedium (80 ml) etwa 30 min (bis zur äußerlich sichtbaren Dissoziation des Zellverbandes) rezirkulierend perfundiert. Nach dem Öffnen der Organkapsel und vorsichtigem Ausschütteln der Zellen wurden in Filtrationsschritten (Mull, Nylon-Gaze 200, 100 µm) größere undissoziierte Gewebeteile und Zellklumpen entfernt und in nachfolgenden differentiellen Zentrifugationsschritten (126) durch Abtrennen von Nichtparenchymzellen und Zelltrümmern weitgehend reine Hepatozytensuspensionen erhalten. Zellausbeuten und Vitalitätsindex wurden durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt (Endkonzentration an Trypanblau 0,14 %).

Die Ausbeute betrug bei einem ca. 250 g schweren Tier im allgemeinen zwischen 350 und 500 x 10^6 vitale Zellen, der

Vitalitätsindex lag bei Hepatozyten von gefütterter Ratte zwischen 80 und 90 %, bei Zellen aus gehungertem Tier zwischen 75 und 85 %.

2.6. Kultivierung der Hepatozyten

2.6.1. Kollagenisolierung und Beschichten der Kulturschalen

Zur Kultivierung der Hepatozyten wurden mit Kollagen beschichtete Plastikpetrischalen verwendet, da sich dieses Substratum als besonders günstig für die Adaptation und Überlebensfähigkeit der Zellen unter in vitro-Bedingungen erwiesen hat (47). Kollagen wurde aus Rattenschwänzen nach der Methode von Loofbourow et al. (98) isoliert. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise ist in (47,102, 126) zu finden. 1,5 g Sehnenmaterial lieferten 3 l essigsaure Kollagenlösung. Die Beschichtung der Kulturschalen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Michalopoulos & Pitot (103). Pro 18 cm^2 Grundfläche wurden 2 ml der verdünnten Kollagenlösung eingesetzt und die Kulturschalen für mindestens 2 Tage im Brutschrank bei 37°C unter UV-Bestrahlung inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Schalen je einmal mit steriler Hanks-Lösung (pH 7,4) mit 0,5 mM EDTA, danach zweimal mit derselben Lösung ohne EDTA gewaschen. Beschichtete Petrischalen können unter Hanks-Lösung ohne Veränderung der Substratum-Eigenschaften drei bis vier Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

2.6.2. Absetzen und Kultivieren der Hepatozyten

Nach dem Auszählen werden die Zellen in Isolationsmedium sedimentiert und das Pellet im Kulturmedium (s. Kap. 2.4.4.) auf 1,25 x 10^6 Zellen/ml verdünnt. Von der homogenen Zellsuspension wurden bei Verwendung viersegmentiger Petrischalen je 1,5 ml pro Segment eingesetzt, woraus sich eine Zelldichte von ca. 0,15 x 10^6 Zellen/cm^2 ergibt. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken der Platten möglichst gleichmäßig verteilt und anschließend im CO_2-Brutschrank (5 % CO_2/95 % Luft (H_2O-gesättigt)) bei 37°C inkubiert. Der erste Medienwechsel erfolgte nach 5 - 6 h, bei Präparationen mit schlechtem Vitalitätsindex noch früher, um nicht-vitale Zellen zu entfernen und eine Schädigung vitaler durch lysosomale Enzyme absterbender Hepatozyten zu verhindern. Die weiteren Medienwechsel erfolgten in 24-stündigem Rhythmus.

2.6.3. Kultivierung und Inkubation in Anwesenheit von Hormonen

Üblicherweise verwendete Konzentrationen waren 10^{-6} M für Dexamethason, Glucagon und T3 sowie 23 mU/ml für Insulin (1,7 x 10^{-7} M). Die Supplementierung erfolgte allgemein in Form der Zugabe entsprechender Volumina der 100-fach (Ins, Gluca, Dex) bzw. 1000-fach (T3) konzentrierten Stammlösungen (2.4.5.) während des Ansetzens der Medien unmittelbar vor dem Gebrauch.

Beim Umsetzen zwischen verschiedenen Hormonbedingungen sowie zu Beginn der Inkubationen im Rahmen der Gluconeogenese-Untersuchungen wurden die kultivierten Zellen einer Waschprozedur unterzogen, um störende Hormonreste zu entfernen. Hierzu wurden die Monolayer zweimal mit je 6 ml pro Platte frischem, serumfreiem Medium (ohne Bicarbonat, siehe 2.4.2.) gewaschen und jeweils sorgfältig abgesaugt.

2.6.4. Inkubation zur Messung der Glucosebilanz

Die Hepatozyten wurden bis zum Beginn der Inkubation am 1. bis 4. Tag (5,5; 27; 48; 72 h) unter verschiedenen Hormonbedingungen im Standardmedium (2.4.4.) kultiviert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Monolayer vor Beginn der Inkubation zweimal mit Waschmedium (2.4.2.) gewaschen, um verbleibende Hormonreste zu entfernen (2 x 1,5 ml pro Segment der 4-segmentigen Falcon-Plastikpetrischalen, ca. 15 min bei Raumtemperatur). Nach dem gründlichen Entfernen (durch Absaugen) des letzten Waschüberstandes wurden die Zellen mit exakt 1,5 ml Inkubationsmedium versetzt (Eppendorf-Pipette) und 21,5 h (siehe Kap. 3.2.1.1.) im Brutschrank (5 % CO_2/95 % Luft, H_2O-gesättigt, 37°C) inkubiert. Als Basismedium für die Inkubation diente allgemein das in 2.4.4. beschriebene Standardmedium, jedoch ohne Glucose-Supplementierung; aufgrund des Serumanteils lag die Konzentration an Glucose zu Beginn der Inkubation, in Abhängigkeit von der Serumcharge, zwischen 0,3 und 0,6 mM. Zur Messung der stimulierten Gluconeogenese wurde dieses Basalmedium mit Glucagon (10^{-6} M) und Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) supplementiert. Die Glucosebilanz, d.h. Glucosebildung oder -aufnahme durch die Zellen wurde über die Veränderung der Glucosekonzentration im Kulturüberstand bestimmt, wobei die Glucosewerte um die gleichzeitig ermittelten Änderungen im Glykogengehalt korrigiert wurden. Zur Ermittlung der Ausgangswerte für Glucose und Glykogen wurden Kontrollplatten, die entsprechend den inkubierten Platten vorbehandelt, d.h. kultiviert und gewaschen wurden, am Beginn der Inkubation aufgearbeitet. Die Messung der Glucose erfolgte nach 2.7.4.1. und 2.7.4.4., die Messung des Glykogens nach 2.7.4.5. und 2.7.4.4.

2.7. Biochemische Messungen

2.7.1. Ernten der Zellen und Herstellen der Homogenate

Nach der Entnahme der Kulturüberstände zur Metabolitbestimmung (Glucose, Harnstoff, Lactat) oder einfachem Dekantieren (Messung der Glucose-6-Phosphatase) wurden die Monolayer mit kalter 0,9 %iger NaCl kräftig gespült (Spritzflasche), um Medienreste sowie tote Zellen, die an der Zellschicht bzw. dem Substratum anhaften, zu entfernen. Aufgrund der nach 3 und 4 Tagen in der Kultur verringerten Haftung der Zellschicht an der Unterlage muß das Spülen zu diesem Zeitpunkt besonders vorsichtig geschehen, da es sonst aufgrund fladigen Ablösens zu einem Verlust an Zellmaterial kommen kann.

Nach dem Spülen wurden die Zellen sofort entweder mit 0,6 N $HClO_4$ (Glykogen-, Gluconeogenese-, Harnstoff-, Lactatbestimmung), oder mit 0,075 M KCl (G6Pase-Messung) versetzt (jeweils 1 ml pro Segment der 4-segmentigen Kulturschalen) und bis zur Aufarbeitung im Eisbad aufbewahrt. Die Entnahme der Zellen erfolgte mittels Gummischaber und einer Pipette mit erweiterter Plastikspitze, womit eine weitgehend verlustfreie Ernte erreicht wurde. Die Proben wurden in 1,5 ml-Plastikröhrchen am Ultraschallgerät, das mit einer angepaßten Spitze versehen wurde (Mikrotip), unter Kühlung homogenisiert, wobei in Abhängigkeit vom Aufnahmemedium verschiedene Zeiten bis zum Erreichen der Homogenität nötig waren: bei der Herstellung der Homogenate für den G6Pase-Test wurden die Proben 12 sec lang beschallt, während für die $HClO_4$-behandelten Proben 20 sec benötigt wurden (Einstellung am Branson-Sonifier B-12: 2,75).

2.7.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteins in den Zellhomogenaten erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (100). 20 - 50 µl-Aliquots der Homogenate wurden mit 2,5 ml Folin C (Na_2CO_3, NaOH, $CuSO_4$, Citrat) versetzt, gemischt (Vortex) und nach 10 - 20-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur mit 0,25 ml Folin D (verdünntes (1 ad 2,2) Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz) unter kräftigem Mischen versetzt. Nach 1 h bei 37°C oder mindestens 2 h bei Zimmertemperatur wurden die Proben bei 578 nm gegen einen Leerwert gemessen. Proteinstandards mit RSA (1 und 2 mg/ml) wurden in jeder Testreihe mitgeführt.

2.7.3. Messung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität (E.C. 3.1.3.9)

Die Monolayer wurden gründlich (Spritzflasche) mit kalter Saline gewaschen, in 0,075 M KCl aufgenommen (1 ml pro Segment der 4-segmentigen Kulturschalen) und mittels Ultraschall homogenisiert (Branson-Sonifier mit Mikrotip, Einstellung 2,75, 12 sec, im Eisbad).

Der G6Pase-Test wurde mit jeweils 50 µl der Zellhomogenate pro Ansatz durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl Substratlösung gestartet (Endkonzentrationen im Test: 20 mM G6P bzw. β-Glycerophosphat, 40 mM Kakodylat-Puffer, pH 6,5) und nach 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad durch Zugabe von 500 µl kalter 12 %iger TCA gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren (Eppendorf-Tischzentrifuge, 1 min) wurde das freigesetzte anorganische Phosphat im Überstand nach der Modifikation der Fiske & Subbarow-Methode (39) von Le Bel et al. (91) anhand von Standardwerten ermittelt; die Messung erfolgte bei 865 nm in Plastikküvetten.

Der Anteil unspezifischer Phosphatase(n) an der gesamten G6P-spaltenden Aktivität, deren Beitrag im Vollhomogenat der Hepatozyten nicht vernachlässigt werden kann, wurde

zwecks Korrektur der G6Pase in Parallelansätzen ermittelt: Die spezifische G6Pase wurde durch Behandlung des Homogenates mit Acetat-Puffer (0,1 M, pH 4,8; 30 min bei 37°C) inaktiviert (155). Die nach dem Zurücktitrieren auf pH 6,5 ermittelte verbleibende G6P-spaltende Aktivität, welche unspezifischen Phosphatasen zuzuordnen ist, wurde um einen Denaturierungsfaktor korrigiert, der sich aus dem Verhältnis des Umsatzes von β-Glycerophosphat vor bzw. nach der Inkubation in Acetat-Puffer ergibt; dieses Substrat wird von der G6Pase praktisch nicht umgesetzt, für die unspezifische(n) Phosphatase(n) ist es ein besseres Substrat als G6P. Der Korrekturfaktor lag im allgemeinen zwischen 1,4 und 1,6; er unterschied sich bei verschieden vorbehandelten Zellen nur wenig, zwischen verschiedenen Inkubationen jedoch stärker, und wurde deshalb für jede Testreihe als Mittelwert der Faktoren mehrerer unterschiedlich vorbehandelter Segmente ermittelt und als solcher zur Korrektur der übrigen Proben eingesetzt.

2.7.4. Metabolitbestimmungen

2.7.4.1. Aufbereiten des Kulturmediums zur Bestimmung von Metaboliten

Die Proben aus dem Kulturüberstand wurden zwecks Entfernens floatenden Zellmaterials abzentrifugiert (Heraeus-Tischzentrifuge, ca. 2000 g, 3 min). 100 µl des klaren Überstandes wurden mit 1 ml 0,6 M $HClO_4$ versetzt und längere Zeit (mind. 10 min) im Eisbad stehengelassen. Anschließend wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand mit 5 M K_2CO_3-Lösung neutralisiert; die Lösung wurde vorsichtig zugegeben und das Entweichen von CO_2 durch kräftiges Mischen (Vortex) beschleunigt. Nach dem Ende der CO_2-Entwicklung wurden die Proben bei 2000 g abzentrifugiert und Aliquots der Überstände für die Metabolitbestimmungen eingesetzt.

2.7.4.2. Bestimmung von Harnstoff

Der Gehalt an Harnstoff im Kulturmedium wurde nach Gutmann & Bergmeyer (56) im gekoppelten Test mittels Urease und Glutamat-Dehydrogenase bestimmt. Hierzu wurden 150 µl des neutralisierten Überstandes (siehe 2.7.4.1.) in einem Testvolumen von insgesamt 1,17 ml eingesetzt und die Extinktionsabnahme bei 340 nm registriert. Die Berechnung erfolgte auf der Basis von Standardwerten, die in jeder Testreihe mitgeführt wurden.

2.7.4.3. Bestimmung von Lactat

Die Messung des Lactatgehaltes im Kulturüberstand erfolgte im neutralisierten Überstand nach Perchlorsäurefällung (2.7.4.1.) entsprechend den Angaben von Gutmann & Wahlefeldt (55). 50 µl des neutralisierten Überstandes wurden in einem Testvolumen von 1,21 ml inkubiert und die Extinktionszunahme bei 340 nm verfolgt.

2.7.4.4. Bestimmung von Glucose

Die Messung freier Glucose erfolgte im Zusammenhang mit Glykogen- und Gluconeogenese-Bestimmungen; in beiden Fällen wurde die Glucoseoxidase/Peroxidase-Methode nach Bergmeyer & Bernt (6) angewandt, bei welcher ABTS^{R} (2,2'-Azino-di-(3-äthylbenzthiazolin)-6-sulfonat) als Chromogen dient. 100 µl Probe aus dem sauren oder neutralisierten Überstand nach Perchlorsäurefällung (2.7.4.1. bzw. 2.7.4.5.) wurden mit 2,5 ml Testmix versetzt, 40 min bei 21^{o}C inkubiert und die Extinktionszunahme bei 420 nm gemessen. Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage von Standardwerten, die in jeder Meßreihe mitgeführt wurden.

2.7.4.5. Bestimmung von Glykogen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten der allgemeinen Bestimmungsmethode angewandt, nach der das Glykogen mittels Amyloglucosidase (AG) zu Glucose abgebaut (83) und diese mit der Glucose-Oxidase (GOD)-Methode (6) bestimmt wird. Die Varianten bestanden in der unterschiedlichen Korrektur freier Glucose sowie in einer unterschiedlichen Empfindlichkeit des Glykogennachweises.

Die Methode von Keppler und Decker (83), bei welcher der Glucoseleerwert, d.h. der Anteil freier Glucose, direkt im Homogenatüberstand bestimmt wird, erwies sich bei der Kombination mit der GOD- statt der Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (HK/G6PDH)-Methode als ungeeignet, da sie zu hohe Leerwerte ergab; diese sind offenbar auf glykogenolytische Fremdaktivitäten zumindest einzelner Chargen der kommerziellen Glucoseoxidase- und/oder Peroxidasepräparationen zurückzuführen. Um die im Vergleich zur HK/G6PDH-Methode weniger aufwendige und empfindlichere GOD-Methode einsetzen zu können, wurden daher Varianten der Glykogenbestimmung angewandt, bei denen die freie Glucose vor der AG-Inkubation entfernt wird.

Zur Bestimmung der Glykogenwerte in Hepatozyten gefütterter Tiere wurde die Methode nach Lust et al. (99) angewandt, bei welcher freie Glucose durch Erhitzen in alkalischem Milieu zerstört wird. Für den Nachweis besonders niedriger Glykogengehalte (< 5 µg/mg Protein) erwies sich diese Methode jedoch als unbefriedigend, da sie einerseits wegen der insgesamt starken Verdünnung der Proben in diesem Bereich nur geringe Empfindlichkeit aufweist und andererseits aufgrund der Bildung störender Substanzen relativ große Korrekturen vorgenommen werden müssen: Während der alkalischen Zerstörung der Glucose entstehen (offenbar reduzierende) Substanzen, welche die Extinktionswerte im GOD/POD/ABTS-Test (6) vermindern, so daß es in Anwesenheit sehr niedriger Glykogenwerte zum Auftreten negativer Werte gegenüber identisch behandelten Leerwerten (Perchlorsäure) kommen

kann. Diese störenden Einflüsse machen Korrekturen erforderlich, die in der Größenordnung der niedrigen Probenwerte selbst liegen; die Korrekturfaktoren können auf der Basis von Kontrollmessungen mittels HK/G6PDH ermittelt werden, da dieser Test nicht gestört wird.

Für die Bestimmung der niedrigen Glykogenwerte in Hepatozyten von gehungerten Tieren wurde eine Modifikation der Methode von Good et al. (51) angewandt; bei dieser Methode wird Glykogen durch Äthanolfällung von freier Glucose abgetrennt. Die Ausfällung des Glykogens erlaubt eine Reduzierung des Inkubationsvolumens und damit eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit; außerdem werden die störenden Substanzen aus der alkalischen Hydrolyse, die in Abänderung der ursprünglichen Methodik (51) zusätzlich durchgeführt wurde und ein mehrmaliges Waschen des Niederschlages überflüssig machte, beim Waschen entfernt.

Die Glykogenbestimmung wurde im einzelnen wie folgt durchgeführt:
Frisch isolierte Hepatozyten wurden durch Zentrifugation (200 g, 3 min) vom glucosehaltigen Isolationsmedium abgetrennt und nach Waschen mit kalter Saline in 0,6 N Perchlorsäure aufgenommen.
Im Falle der kultivierten Hepatozyten wurden die Monolayer in der Kulturschale gründlich mit kalter Saline gewaschen und sofort mit 0,6 N Perchlorsäure versetzt (1 ml pro Segment der viersegmentigen Falcon-Plastik-Petrischalen).
Die Proben wurden nach dem Ernten (Gummischaber) mittels Ultraschall homogenisiert (Branson-Sonifier mit Mikrotip, Einstellung 2,75, 20 s) und die Homogenate in Abhängigkeit von der angewandten Methode unterschiedlich weiterbehandelt.

Variante A: nach Lust et al. (99)

200 µl des Zellhomogenats in 0,6 N Perchlorsäure wurden in Eppendorf-Cups mit 100 µl 1,55 N KOH versetzt (Endkonzentration ca. 0,1 N KOH) und 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt, um die freie Glucose zu zerstören. Nach dem Abküh-

len wurden die Proben mit Essigsäure und Acetatpuffer (50 µl 1 N HAc, 450 µl 0,2 M NaAc-Puffer, pH 4,8) auf pH 4,8 eingestellt und die Glykogenolyse durch Zugabe von 200 µl Amyloglucosidase-Suspension (1 mg/ml NaAc-Puffer, 0,2 M, pH 4,8) gestartet. Nach 2-stündiger Inkubation bei 45°C im Schüttelwasserbad wurden die Proben mit jeweils 100 µl 5,5 N $HClO_4$ versetzt, in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und die freigesetzte Glucose in 100 µl-Aliquots des sauren, oder durch Zugabe von 80 µl 5 M K_2CO_3 neutralisierten Überstandes mit der Glucoseoxidase-Methode gemessen ((6),s. 2.7.4.4.). Zur Kontrolle wurden Glykogenstandards mitinkubiert.

Variante B: Modifikation der Methode von Good et al. (51)

400 µl des Zellhomogenats in 0,6 N $HClO_4$ wurden in Eppendorf-Cups mit 50 µl 10 N KOH versetzt und 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 50 µl 1 M Na_2SO_4, danach 1 ml absoluter Äthanol hinzupipettiert und die Proben für 5 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert, um ein gleichmäßiges Ausfällen des Na_2SO_4-Niederschlags mit adsorbiertem Glykogen zu erreichen. Nach dem langsamen Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden die Proben abzentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge, 1 min) und die Niederschläge nach einmaligem Waschen mit 1 ml 66 % Äthanol über Nacht an der Luft getrocknet. Zur Glykogenolyse wurden die Sedimente mit jeweils 500 µl Amyloglucosidase-Suspension (0,2 mg/ml in NaAc-Puffer, 0,2 M, pH 4,8) versetzt und 2 h bei 45°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von je 50 µl 5,5 N $HClO_4$ wurden die Proben in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert (1 min) und die freigesetzte Glucose in 100 µl-Aliquots des Überstandes wie bei Variante A bestimmt.

Die Vollständigkeit der Fällung und Hydrolyse wurde durch Mitführen von Glykogenstandards überprüft und korrigiert. Mit dieser Methode können Glykogengehalte von < 1 µg/mg Protein empfindlich nachgewiesen werden.

2.8. Zytochemische Lokalisierung der Glucose-6-Phosphatase

Die Monolayer wurde gründlich (Spritzflasche) mit kalter Saline gespült und kurz mit eiskaltem Saccharose/Kakodylat-Puffer äquilibriert (7,5 %/0,1 M, pH 7,2; 1 ml pro Segment der viersegmentigen Kulturschalen). Danach wurden die Zellen mit 2,5 %igem Glutardialdehyd in Kakodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,2) im Eisbad fixiert: Eine 25 %ige Glutardialdehyd-Stammlösung (Sigma) wurde im Gefrierschrank aufbewahrt und direkt vor der Verwendung mit eiskaltem Puffer verdünnt; 2 ml dieser Lösung wurden pro Segment eingesetzt und die Fixation im allgemeinen 1 - 2 min durchgeführt, am 1. Tag jedoch für 2 - 10 min (s. Bild 1, Kap. 3.3.2.), da hierdurch eine bessere Strukturerhaltung bei qualitativ gleicher zytochemischer Reaktion erreicht wurde.

Zum Entfernen des Fixans wurde die Layer in der Kälte gründlich mit Saline, dann mit Saccharose/Kakodylat-Puffer gewaschen (zweimal mit jeweils 2 ml pro Segment, insgesamt mindestens 10 min). Anschließend wurden die Zellen mit 10 %iger Glycerinlösung inkubiert (2 ml pro Segment; 1 h bei 0-4 ^{o}C), um eine gute Strukturerhaltung während der folgenden Permeabilisierungsbehandlung zu erreichen. Nach dem Entfernen der Glycerinlösung wurden die Zellen 4 Einfrier-(Auftauzyklen unterworfen, um sie für die zytochemischen Substrate permeabel zu machen. Ein schnelles Einfrieren wurde erreicht, indem die Kulturschalen auf einem Kältebad (Methanol/CO_2) bewegt wurden; dabei mußte besonders darauf geachtet werden, daß es unter der starken Blasenbildung beim Abkühlen nicht zu einem Einspritzen organischen Lösungsmittels in die Kulturschale kommt, da dies zu einer lokalen G6Pase-Desaktivierung führen würde. Das Auftauen erfolgte in entsprechender Weise auf einem erwärmten Wasserbad. Um eine möglichst homogene Feuchtigkeitsschicht und damit ein gleichmäßiges Einfrieren zu erreichen, wurden die Zellen zwischen den einzelnen Einfrierschritten mit kalter 10 %-iger Glycerinlösung überschichtet und diese wieder entfernt. Bereits nach einem Einfrier-/Auftau-Zyklus waren praktisch

alle Hepatozyten mit Trypanblau anfärbbar. Nach dem Permeabilisieren wurden die Zellen kurz mit warmer Saline (37°C) gewaschen und mit dem ebenfalls vorgewärmten (37°C) Inkubationsmix nach Wachstein & Meisel (151) versetzt (1,5 ml pro Segment). Dieser Mix wird direkt vor der Verwendung aus den folgenden Lösungen hergestellt (97):

20 ml	0,125 %ige G6P-Lösung (Mononatriumsalz, in aqua dest.) bzw. 0,125 %ige β-Glycerophosphat-Lösung (Kontrolle)
20 ml	0,2 M Tris/Maleat-Puffer, pH 6,5
3 ml	3 %ige $Pb(NO_3)_2$-Lösung
7 ml	aqua dest.

Zum Entfernen von störendem CO_2 (sonst Bleicarbonat-Niederschlag) müssen die Lösungen zuvor entgast bzw. erhitzt werden. Die Zugabe der Bleinitratlösung erfolgte tropfenweise unter kräftigem Rühren bei 37°C, am Schluß sehr langsam, da es sonst zu Trübungen kommt, die sich nur schwer wieder auflösen. Anschließend wird die Inkubationsmischung ca. 15-30 min bei 37°C im Wasserbad gehalten und direkt vor dem Gebrauch über ein Papierfilter abfiltriert.

Die Zellen wurden 1 h (am 1. Tag 30-45 min) bei 37°C inkubiert, wobei die Kulturplatten auf der Oberfläche eines Wasserbades schwammen; während der Inkubation darf keine Trübung der Inkubationslösung auftreten, da es sonst zu unspezifischen Ausfällungen und Anfärbungen kommt. Anschließend wurde die Monolayer bei Raumtemperatur gründlich mit Saline gespült, 1 min mit 0,5 %iger gelber Ammoniumsulfidlösung behandelt (1,5 ml pro Segment, aus 20 %iger Lösung (Merck) frisch mit aqua dest. verdünnt) und nach dem Dekantieren des Reagenzes gründlich mit Saline gespült.

Die Auswertung und Dokumentation der zytochemischen Reaktion erfolgte mittels Lichtmikroskop (Leitz, "Diavert"), wobei es sich als empfehlenswert erwies, ohne Phasenkontrast zu beobachten, da dieser zu einer Verminderung von Intensitätsdifferenzen führt, und für die photographischen Aufnahmen (Filmmaterial: Kodak Plus-X pan, 22 DIN) ein Blaufilter zu verwenden.

In azidhaltiger Saline konnten die Zellen eine zeitlang im Kühlschrank aufbewahrt werden; dabei wurde allerdings, vermutlich aufgrund von Oxidationsvorgängen, ein deutlicher Rückgang der Intensität der zytochemischen Anfärbung (Braunfärbung) beobachtet.

2.9. Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden in der Regel als Mittelwerte einschließlich Standardabweichungen (bei drei und mehr unabhängigen Bestimmungen) angegeben. Ist in einer Tabelle oder Abbildung keine Standardabweichung aufgeführt oder eingezeichnet, so stellen die angegebenen Werte stets Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung dar.

Zur Bestimmung der Irrtumswahrscheinlichkeit (siehe Tab. 7) wurde der t-Test verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Glykogen

Die Untersuchung des Einflusses einzelner Effektoren (Hormone, Substrate) auf den Glykogenstoffwechsel wird in vivo dadurch kompliziert, daß als Folge der Applikation unübersichtliche Änderungen im Wirkungsgefüge insbesondere von Hormonen auftreten können. So ist der Einfluß von Glucose und Insulin in vivo nur schwer zu differenzieren, da sich diese Faktoren gegenseitig in ihren Plasmakonzentrationen stark beeinflussen (62). Als weiteres Beispiel einer solchen Wechselwirkung in vivo kann der glykogene Effekt der Glucocorticoide dienen, der zumindest teilweise auf eine verstärkte Insulinausschüttung zurückzuführen ist (150,159). Solche Nebeneffekte sind an isolierten Systemen wie perfundierter Leber und isolierten Hepatozyten auszuschließen. Diese in vitro-Systeme erwiesen sich allerdings im Hinblick auf die Fähigkeit zur Glykogensynthese als nur bedingt geeignet für einen direkten Vergleich mit der Situation in vivo, da sie sich, im Gegensatz zu ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber glykogenolytischen Einflüssen, als wenig empfindlich gegenüber dem glykogenen Einfluß physiologischer Glucosekonzentrationen (152) und in den meisten Fällen als unempfindlich gegenüber Insulin erwiesen (50). Demgegenüber sollten kultivierte Hepatozyten ein besser geeignetes in vitro-System darstellen, da sich die Zellen in der Kultur einerseits von dem Trauma der Isolierungsprozedur, mit ihren vielfältigen Effekten auf das intrazelluläre Substrat- und Ionenmilieu und möglichen Beeinträchtigungen von Hormonrezeptoren erholen können, und andererseits auch längere Zeit beanspruchende Hormoneffekte untersucht werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Substrat- und Hormonbedingungen auf die Glykogen-

spiegel von Hepatozyten gefütterter und gehungerter Ratten während mehrtägiger Kultivierung untersucht. Weitere Glykogenmessungen wurden im Zusammenhang mit Gluconeogeneseuntersuchungen durchgeführt, wobei es darum ging, die Glucosewerte um die Änderungen der Glykogenspiegel während der Inkubationen zu korrigieren (s. Kap. 2.6.4.).

3.1.1. Glykogenspiegel in kultivierten Hepatozyten von gefütterter Ratte

3.1.1.1. Isolierung und Absetzphase

Die Glykogenwerte in frisch isolierten Hepatozyten aus gefütterten Ratten können sich zwischen einzelnen Präparationen deutlich unterscheiden: als Mittelwert von 17 verschiedenen Präparationen wurden 164 ± 43 µg Glykogen/mg Protein ermittelt. Diese Mittelwerte entsprechen ca. 50 - 60 % des Glykogengehaltes der Leber in vivo (83). Die Differenzen zwischen verschiedenen Präparationen können auf unterschiedlichen Ausgangswerten in den Organen beruhen, etwa aufgrund individueller Unterschiede zwischen den Tieren, eines unterschiedlichen Zeitpunktes der Zellisolation innerhalb der postabsorptiven Phase oder streßbedingter Glykogenolyse. Größere Bedeutung dürfte jedoch den unterschiedlichen Glykogenverlusten während der eigentlichen Isolierungsprozedur zukommen, vor allem während der rezirkulierenden Perfusion mit Kollagenase. Eine gleichförmige und schnelle Dissoziation der Leber begünstigt die Beibehaltung hoher Glykogengehalte in den Hepatozyten, da hierbei offenbar hypoxische, die Glykogenolyse stimulierende Bedingungen vermieden werden. Die Gefahr der Hypoxie besteht auch in den Zellsedimenten während der Zentrifugationsschritte der Isolierungsprozedur, die hierbei auftretenden Verluste können jedoch durch die Verwendung kalter, O_2-begaster Medien gering gehalten werden.

In der Absetzphase der Primärkultur kommt es unter Normalbedingungen, d.h. in Anwesenheit von 5,5 mM Glucose im Kulturmedium zu einer drastischen Abnahme des Glykogengehalts: Nach 5 h werden nur noch ca. 50 µg Glykogen/mg Protein gefunden. Diese Abnahme ist durch die Anwesenheit von Insulin nur unwesentlich zu beeinflussen, sie kann jedoch durch gleichzeitige Erhöhung der Glucosekonzentration deutlich vermindert werden: in Anwesenheit von 22 mM Glucose werden zum gleichen Zeitpunkt ca. 100 µg Glykogen/mg Protein gemessen.

3.1.1.2. Einfluß verschiedener Hormonbedingungen während mehrtägiger Kultivierung im Normalmedium

Der Einfluß von Insulin, Glucagon und Dexamethason, denen in vivo eine herausragende Rolle im Glykogenstoffwechsel zukommt, auf den Glykogenspiegel kultivierter Hepatozyten wurde an Zellen gefütterter Tiere während einer 4-tägigen Kultivierung im Normalmedium (5,5 mM Glucose) untersucht. Die Tabelle 1 zeigt den Verlauf des Glykogengehaltes bei Hepatozyten, die nach gemeinsamem Absetzen unter Ins/Dex vom ersten Medienwechsel an unter verschiedenen Hormonbedingungen kultiviert wurden.

Nach einem Tag in der Kultur wird unter allen Hormonbedingungen der jeweils niedrigste Wert der gesamten Kultivierungszeit gefunden. Der während der Absetzphase beobachtete Verlust (s. Kap. 3.1.1.1.) setzt sich also fort, und der Glykogenspiegel fällt auch in Anwesenheit der am wirksamsten stabilisierenden Hormonkombination Ins/Dex auf einen Wert ab, der nur ca. 10 - 15 % des Ausgangswertes in den frisch isolierten Zellen entspricht. Unter den übrigen Hormonbedingungen liegt der Glykogengehalt noch deutlich niedriger: Unter Dex wird kein, unter Insulin nur ein geringer stabilisierender Effekt gegenüber den Kontrollen gefunden, während unter Ins/Dex/Gluca der glykogenolytische Einfluß

Tabelle 1: Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in Normalmedium (5,5 mM Glucose) auf den Glykogengehalt kutlivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte.
Hormone: Insulin: 23 mU/ml; Glucagon, Dexamethason: 10^{-6} M
( ): Anzahl verschiedener Primärkulturen

	Kultivierungszeit (Tage)			
	1	2	3	4
Hormone	µg Glykogen/mg Protein			
Kontrolle	4 ± 3 (3)	9 ± 5 (5)	9 ± 6 (4)	9 ± 5 (3)
Ins	9 ± 4 (3)	14 (2)	13 (2)	n.b.
Dex	4 ± 2 (4)	5 ± 2 (7)	6 ± 1 (3)	6 (2)
Ins/Dex	21 ±13 (5)	37 ±12 (9)	40 ±11 (6)	30 ± 8 (4)
Ins/Dex/ Gluca	8 ± 6 (6)	27 ±12 (6)	36 ±10 (4)	28 ± 2 (4)

des Glucagons den stabilisierenden Effekt von Ins/Dex fast vollständig aufhebt.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung kommt es allgemein zu einem Wiederanstieg der Glykogenspiegel. Unter Kontrollbedingungen sowie in Anwesenheit von Dex oder Ins ist diese Zunahme jedoch nur gering, und die Werte verbleiben für den Rest der Kultivierungszeit auf dem bereits nach zwei Tagen erreichten niedrigen Niveau. Unter Ins/Dex steigt der Glykogengehalt bis zum 3. Tag auf etwa das Doppelte des Wertes nach dem 1. Tag an und beträgt dann ca. 25 % des Wertes in den frisch isolierten Zellen; danach geht er im allgemeinen wieder leicht zurück.

In Anwesenheit von Ins/Dex/Gluca kommt es, ausgehend von dem niedrigen Wert nach einem Tag, während der folgenden beiden Tage über eine deutliche Zunahme des Glykogenspiegels zu einer Annäherung an die Werte von Ins/Dex-kultivier-

ten Zellen und analogem Verlauf am 3. und 4. Tag. Dieser Verlauf zeigt, daß der am 1. Tag beobachtete überwiegende glykogenolytische Einfluß des Glucagons im weiteren Verlauf durch die glykogene Wirkung der Glucagon-stimulierten Gluconeogenese (hier vor allem aus den Aminosäuren des Mediums) kompensiert wird.

Bei zusammenfassender Betrachtung von Tab. 1 ist festzustellen, daß die Hepatozyten im Normalmedium, d.h. in Anwesenheit von 5,5 mM Glucose, nur relativ geringe Glykogenspiegel aufzubauen vermögen; selbst unter stimulierenden Hormonbedingungen (Ins/Dex, Ins/Dex/Gluca) erreichen die Werte hier nur ca. 25 % des Glykogengehaltes frisch isolierter Zellen vom gefütterten Tier. Weiterhin ist bemerkenswert, daß die glykogene Wirkung der Einzelzugabe von Dex oder Ins, die in vivo die Glykogensynthese zu stimulieren vermögen, hier nur schwach ausgeprägt (Ins) bzw. eher negativ (Dex) ist im Vergleich zu den Kontrollbedingungen. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Hormone ist ein deutlich stimulierender Einfluß auf den Glykogengehalt der kultivierten Hepatozyten festzustellen. Dex übt also offenbar einen permissiven Einfluß auf die glykogene Wirkung des Insulins aus (s. Diskussion, Kap. 4.1.).

3.1.1.3. Einfluß hoher Glucosekonzentrationen

Eine Anhebung der Glucosekonzentration im Medium hat unter konstanten Hormonbedingungen einen deutlich positiven Effekt auf den Glykogenspiegel der kultivierten Hepatozyten. Nach 3 Tagen in der Kultur, wenn allgemein maximale Glykogenwerte beobachtet werden, wurden unter Kontrollbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Hormonsupplemente, in Anwesenheit von 5,5 mM bzw. 16,5 mM Glucose Gehalte von 5 bzw. 58 µg Glykogen/mg Protein gemessen, während gleichzeitig unter Ins/Dex 35 bzw. 156 µg/mg gefunden wurden.

In der Tabelle 2 ist der Verlauf der Glykogenwerte während einer viertägigen Kultivierung unter glykogenen, den Aufbau begünstigenden Hormonbedingungen in Anwesenheit normaler (5,5 mM) bzw. hoher (22 mM) Glucosekonzentrationen dargestellt. Die Hepatozyten wurden gemeinsam in Medium mit Ins/Dex und 22 mM Glucose abgesetzt, d.h. unter Bedingungen, die den anfänglichen Glykogenverlust vermindern, und wiesen deshalb beim ersten Medienwechsel (nach 3 h) einen hohen Glykogengehalt auf (102 µg/mg Protein).

Tabelle 2: Einfluß normaler und hoher Glucosekonzentration auf den Glykogengehalt kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte während viertägiger Kultivierung

Hormone: Insulin: 23 mU/ml; Dexamethason, Glucagon: 10^{-6} M
(einzelne Kultur)

Hormone	Glucose (mM)	Kultivierungszeit (Tage) 1	2	3	4
		µg Glykogen/mg Protein			
Ins/Dex	5,5	32	33	35	26
	22	118	133	198	167
Ins/Dex/Gluca	5,5	9	33	40	25
	22	33	97	130	126

Beim Wechsel auf Medium mit Ins/Dex und 5,5 mM Glucose nimmt der Glykogengehalt während des 1. Tages deutlich ab und verbleibt im weiteren Verlauf der Kultivierung auf einem gegenüber in vivo-Werten vergleichsweise niedrigen Niveau (vgl. Tab. 1). In Anwesenheit hoher Glucose kommt es unter diesen Hormonbedingungen zu einer Stabilisierung der

hohen Anfangswerte und in der Folge zu einem deutlichen Anstieg des Glykogengehalts, so daß nach 3 und 4 Tagen in der Kultur Glykogenspiegel erreicht werden, die im Bereich hoher Werte in frisch isolierten Hepatozyten liegen.

Unter Ins/Dex/Gluca wird während des ersten Kulturtages in Anwesenheit normaler und hoher Glucose eine starke Abnahme des Glykogengehaltes beobachtet; der glykogenolytische Effekt des Glucagons überwiegt in dieser Phase offensichtlich auch gegenüber dem glykogenen Einfluß der hohen Glucose und Ins/Dex. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nimmt der Glykogenspiegel unter diesen Hormonbedingungen in Anwesenheit normaler und hoher Glucose wieder deutlich zu: Unter 5,5 mM Glucose werden dabei ab 48 h ähnliche Werte wie unter Ins/Dex gemessen; unter hoher Glucose werden die entsprechenden Spiegel nicht erreicht, jedoch ist die Zunahme, von dem niedrigen Niveau nach einem Tag ausgehend, während des 2. und 3. Kulturtages mit der zur gleichen Zeit unter Ins/Dex beobachteten quantitativ vergleichbar.

Zwischen dem 3. und 4. Kulturtag kommt es unter allen dargestellten Bedingungen zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Rückgang der Glykogenspiegel (s. Diskussion, Kap. 4.1.).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die kultivierten Hepatozyten unter geeigneten Bedingungen hohe Glykogenspiegel zu erreichen und für längere Zeit aufrechtzuerhalten vermögen.

Die Tatsache, daß zur Wiedergewinnung und Beibehaltung von Glykogengehalten, die den Werten in vivo nahekommen, unphysiologisch hohe Glucosekonzentrationen eingesetzt werden müssen, weist darauf hin, daß die Glucoseschwelle, d.h. die Konzentration, bei der es zu einem autoregulatorischen Umschalten des Lebergewebes von der Glykogenolyse zur Glykogenese kommt, in kultivierten Hepatozyten gegenüber dem Schwellenwert in vivo deutlich erhöht ist; in vivo erlauben physiologische Konzentrationen (5 - 8 mM) die Aufrechterhaltung hoher Glykogenwerte. Ähnliche Beobachtungen über einen Anstieg der Glucoseschwelle wurden für andere in vitro-Sy-

steme der Leber beschrieben: an perfundierter Leber und isolierten Hepatozyten wurden Werte zwischen 10 und 30 mM ermittelt (146). Beim Vergleich mit der Situation in vivo ist allerdings zu beachten, daß dort neben dem Beitrag externer Glucose gleichzeitig mit einem zusätzlichen Beitrag gluconeogenetischer Substrate zur Glykogensynthese gerechnet werden muß, wobei vor allem Lactat im Rahmen des Cori-Zyklus und glucoplastische Aminosäuren, insbesondere Glutamin und Alanin, eine größere Rolle spielen dürften (77,79).

3.1.1.4. Einfluß gluconeogenetischer Substrate

Der Einfluß, den gluconeogenetische Substrate in Anwesenheit physiologischer Glucosekonzentrationen (5,5 mM) auf den Glykogengehalt kultivierter Hepatozyten ausüben, wurde unter Hormonbedingungen untersucht, welche die Gluconeogenese unterschiedlich beeinflussen (s. Kap. 3.2.). Als gluconeogenetische Substrate wurden Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) bzw. Fructose (2 mM) eingesetzt. Diese auch physiologisch bedeutsamen Substrate werden an verschiedenen Stellen in die Gluconeogenese eingeschleust: Pyruvat/Lactat durchläuft die gesamte Sequenz, beginnend mit der mitochondrialen Pyruvat-Carboxylase-Reaktion, während Fructose auf der Ebene der Triosephosphate in die Reaktionsfolge eintritt und nur die beiden zytoplasmatischen limitierenden Schritte von Gluconeogenese bzw. Glykogensynthese, FDPase/G6Pase bzw. FDPase/Glykogensynthase zu durchlaufen hat. Aufgrund dieser geringeren Limitierung innerhalb der Gluconeogenesesequenz und der hohen Aktivität der zuliefernden Enzyme Fructokinase und Aldolase ist die Fructose ein besonders gutes Substrat der Gluconeogenese. Unabhängig von seiner Eigenschaft als Glucosevorstufe hat Fructose auch die Eigenschaft, die Glykogensynthese direkt zu stimulieren (79).

Tabelle 3 zeigt den Verlauf der Glykogenwerte während einer 3-tägigen Kultivierung von Hepatozyten aus gefütterter Ratte unter verschiedenen Substrat- und Hormonbedingungen.

Tabelle 3: Einfluß gluconeogenetischer Substrate auf den Glykogengehalt kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Insulin: 23 mU/ml; Glucagon, Dexamethason: 10^{-6} M
Substrate: Kontrolle: 5,5 mM Glucose, Fructose: 2 mM Fructose, Pyruvat/Lactat: 1,5/15 mM Pyruvat/Lactat
(Die Werte stellen Mittelwerte von jeweils 2 Kulturschalen einer Kultur dar)

		Kultivierungszeit (Tage)		
		1	2	3
Hormone	Substrate	µg Glykogen/mg Protein		
Kontrolle	Kontrolle	8	6	6
	Fruc	14	24	17
	Pyr/Lac	13	12	8
Ins	Kontrolle	13	12	12
	Fruc	29	32	19
	Pyr/Lac	10	14	12
Ins/Dex/Gluca	Kontrolle	10	29	26
	Fruc	41	58	71
	Pyr/Lac	13	63	115

Unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Ins, d.h. unter Bedingungen, unter denen die Gluconeogenese gering bzw. die Glucoseaufnahme bevorzugt ist (s. Kap. 3.2.), werden allgemein nur niedrige Glykogengehalte gefunden. Während allerdings Pyr/Lac-Supplementation unter diesen Bedingungen einen nur geringen (Kontrolle) bzw. keinen signifikanten Einfluß (Ins) gegenüber den unsupplementierten Kontrollen zeigt, liegen die Werte in Anwesenheit von Fructose unter beiden Hormonbedingungen deutlich höher.

Unter Ins/Gluca/Dex, d.h. unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen (s. Kap. 3.2.), werden vom 2. Tag an unter allen Substratbedingungen höhere Glykogenspiegel gefunden als unter nichtstimulierenden Hormonbedingungen (Ins, K). In Anwesenheit gluconeogenetischer Substrate nimmt der Glykogengehalt unter Ins/Dex/Gluca während der gesamten Kulturdauer zu, wobei sich in Abhängigkeit vom Substrat ein unterschiedlicher Verlauf ergibt. Während in Anwesenheit von Pyruvat/Lactat nach einem Tag ein von unsupplementiertem Medium nur wenig verschiedener Glykogenspiegel gefunden wird, liegt der Gehalt in Anwesenheit von Fructose zu diesem Zeitpunkt deutlich höher. In der Folge nimmt der Glykogengehalt unter Fructose nur noch vergleichsweise wenig zu, während er unter Pyruvat/Lactat, von dem nach einem Tag sehr niedrigen Wert ausgehend, stark ansteigt und nach 3 Tagen den Wert unter Fructose deutlich übertrifft.

Fructose vermag, im Gegensatz zu Pyr/Lac, den Rückgang der Glykogenspiegel in der glykogenolytischen Anfangsphase deutlich zu vermindern. Mit zunehmender Kulturdauer überwiegt der glykogene Einfluß der stimulierten Gluconeogenese und es kommt in Anwesenheit beider gluconeogenetischer Substrate zu einem Anstieg des Glykogens.

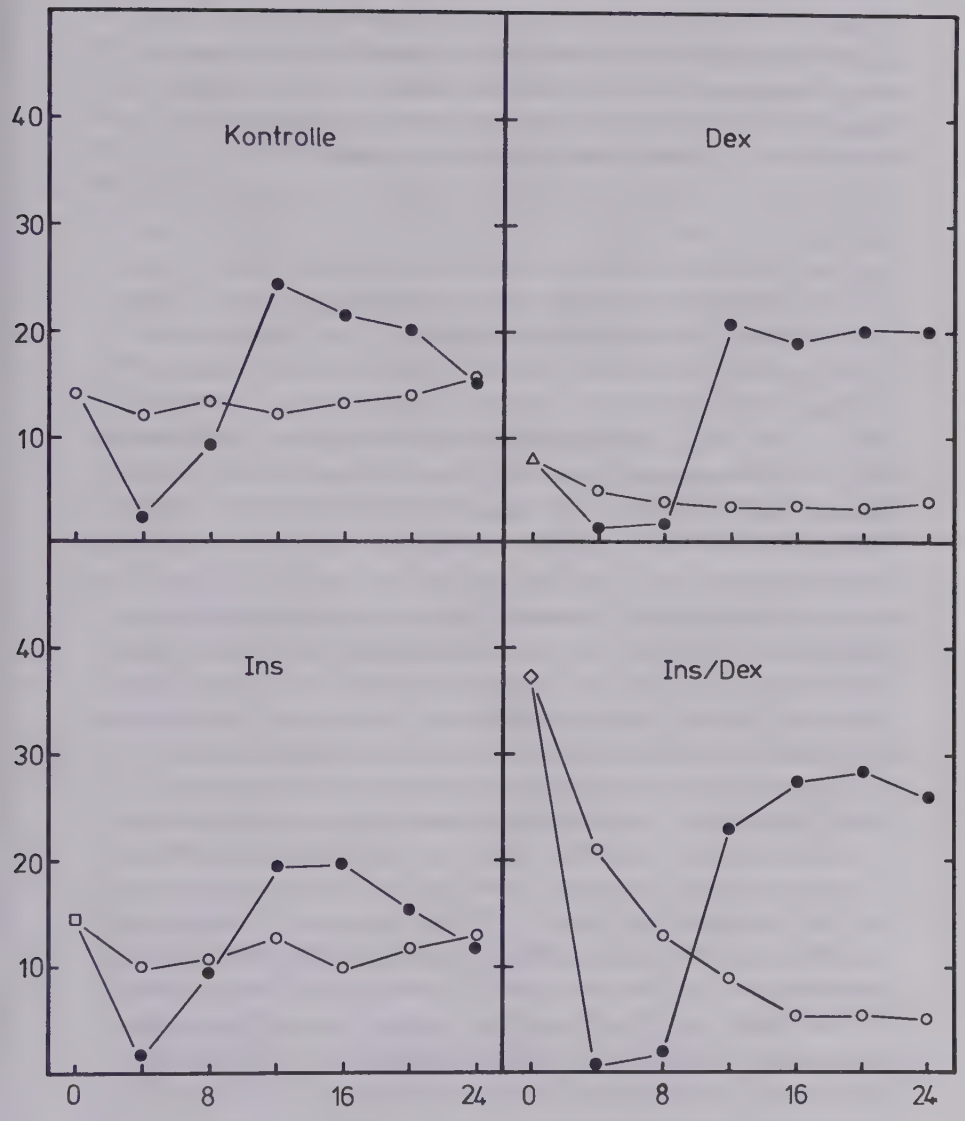
Diese Ergebnisse zeigen, daß die kultivierten Zellen unter dem Einfluß gluconeogenetischer Substrate auch in Normalmedium (5,5 mM Glucose) hohe Glykogenwerte erreichen und aufrechterhalten können, wenn sie in Anwesenheit von Ins/Dex/Gluca, d.h. unter gleichzeitig gluconeogenetischen und glykogenen Hormonbedingungen kultiviert werden. Unter nichtstimulierenden Bedingungen (K, Ins) zeigen die Substrate einen deutlich geringeren Effekt, und nur im Falle der Fructose werden durchgehend deutlich höhere Glykogenspiegel als in den unsupplementierten Kontrollen gefunden.

3.1.1.5. Zeitlicher Verlauf der Glykogenspiegel während der Inkubationsperiode zur Bestimmung der Glucosebilanz

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Gluconeogenese (s. Kap. 3.2.) wurden die aus Messungen im Kulturüberstand ermittelten Glucosewerte um die Änderungen der zellulären Glykogenspiegel korrigiert; hierzu wurden die jeweiligen Gehalte zu Beginn und am Ende der Inkubationsperiode bestimmt und die Differenzen in Glucosewerte umgerechnet.

Bei Untersuchungen an einzelnen Kulturen, in denen der zeitliche Verlauf der Glucosebildung innerhalb der üblichen Inkubationsperiode ermittelt wurde, wurden gleichzeitig typische zeitliche Veränderungen in den Glykogenspiegeln der inkubierten Hepatozyten beobachtet. In Abb. 1 ist der Verlauf der Glykogenwerte während einer 24-stündigen Inkubation am 3. Tag (Beginn 43 h nach dem Absetzen) nach Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen (K, Dex, Ins, Ins/Dex) dargestellt; die Inkubation erfolgte einerseits unter basalen Bedingungen, d.h. in serumhaltigem, glucosefreiem W/AB-77-Medium ohne Hormonsupplemente, andererseits unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von Glucagon (10^{-6} M) und Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM); die Messungen wurden im Abstand von jeweils vier Stunden vorgenommen. Die Ergebnisse der gleichzeitig ermittelten Gluconeogenese werden in anderem Zusammenhang dargestellt (s. Abb. 4).

Abb. 1: Zeitlicher Verlauf des Glykogengehaltes während 24-stündiger Inkubation unter basalen und Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung (Hepatozyten von gefütterter Ratte, 3. Tag, einzelne Kultur)
Kultivierung: ○: Kontrolle; △: Dexamethason; □: Insulin; ◇: Insulin/Dexamethason
Hormonkonzentrationen: Insulin: 23 mU/ml; Dexamethason: 10^{-6} M
Inkubation: offene Symbole: basale Bedingungen; geschlossene Symbole: stimulierende Bedingungen (Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM))
Abszisse: µg Glykogen/mg Protein
Ordinate: Inkubationszeit (h)


Kontrolle
Dex
Ins
Ins/Dex
40
30
20
10
0
8
16
24

Unter basalen Bedingungen (s. Kap. 2.6.4.) wird nach Ins/Dex-Vorbehandlung, d.h. bei relativ hohen Glykogen-Ausgangswerten, in der ersten Hälfte der Inkubationsperiode eine starke Abnahme, danach eine Stabilisierung auf niedrigem Niveau beobachtet; nach Ins oder Dex wird unter denselben Bedingungen eine geringe Abnahme, nach hormonfreier Kultivierung keine signifikante Änderung gefunden.

Unter stimulierenden Bedingungen (Gluca + Pyr/Lac) zeigt sich in allen Fällen ein von den Kontrollbedingungen deutlich verschiedener Verlauf: Während der ersten 4 - 8 h werden, als Folge der verstärkten Glykogenolyse unter Glucagon, gegenüber den Ausgangswerten drastisch verringerte Glykogenspiegel gemessen; in der Folge kommt es zu einer raschen Resynthese, wobei die erreichten Werte im Falle der K-, Dex- und Ins-vorbehandelten Hepatozyten die niedrigen Ausgangswerte zu Beginn der Inkubation übertreffen, im Falle von Ins/Dex den hohen initialen Gehalt jedoch nicht wieder erreichen.

Während die in der ersten Hälfte der Inkubationsperiode erreichten Glykogenspiegel nach Ins/Dex- und Dex-Vorbehandlung während der zweiten Hälfte praktisch unverändert bleiben, nehmen sie nach Ins- und K-Behandlung in dieser Phase wieder ab. Dieser Verlauf entspricht dem der Glucosebildung unter diesen Bedingungen: Während nach Ins/Dex und Dex durchgehend eine aktive Glucosebildung beobachtet wird, findet unter den beiden anderen Bedingungen in dieser Phase keine Zunahme (Ins) bzw. eine geringe Abnahme der Glucose im Kulturüberstand statt (Abb. 4). Diese Ergebnisse weisen auf die wichtige Rolle hin, die eine aktive Gluconeogenese für die Aufrechterhaltung des Glykogengehaltes spielt, insbesondere bei nur geringer extrazellulärer Glucosekonzentration, wie unter den hier angewandten Inkubationsbedingungen: Die Konzentration stieg während der 24-stündigen Inkubation von anfangs 0,4 mM auf maximal 3 mM (unter stimulierenden Bedingungen) an.

3.1.2. Glykogenspiegel in kultivierten Hepatozyten von gehungerter Ratte

Die Messungen von Glykogengehalten kultivierter Hepatozyten aus gehungerter Ratte erfolgte im Rahmen der Untersuchungen zur Gluconeogenese: Um Korrekturen der Glucosewerte für die jeweiligen Veränderungen der zellulären Glykogenspiegel vornehmen zu können, wurden die Glykogenwerte zu Beginn und am Ende der Inkubationsperiode bestimmt (s. Kap. 2.6.4.).

Da der Glykogengehalt in kultivierten Hepatozyten von gehungerter Ratte allgemein niedriger liegt als in Hepatozyten vom gefütterten Tier, wurde die empfindlichere Variante B der Methode zur Glykogenbestimmung angewandt (s. Kap. 2.7.4.5.).

Die Ergebnisse lassen sich kurz zusammenfassen:
In frisch isolierten Hepatozyten von gehungerter Ratte war Glykogen allgemein nicht nachzuweisen. Bei der Kultivierung in Normalmedium (5,5 mM Glucose) wurden unter den im Rahmen der Gluconeogeneseuntersuchungen üblicherweise angewandten Hormonbedingungen, d.h. unter ± Glucagon ± Dexamethason, sehr geringe Glykogenwerte gefunden, die allgemein zwischen 1 und 5 µg/mg Protein lagen. In Analogie zu den Ergebnissen an Hepatozyten von gefütterter Ratte erwies sich die längerfristige Anwesenheit der Hormonkombinationen Ins/Dex bzw. Ins/Dex/Gluca als Voraussetzung für die Resynthese höherer Glykogenspiegel: unter diesen Bedingungen wurden ähnliche Werte wie im Falle der Hepatozyten vom gefütterten Tier erreicht (30 - 40 µg/mg Protein). Aus unbekanntem, nicht näher untersuchtem Grunde zeigen jedoch einzelne Kulturen eine deutlich geringere Stimulierbarkeit durch Insulin/Dexamethason; in diesen Fällen wurden weniger als 10 µg Glycogen/mg Protein gefunden, während die Fähigkeit zur Gluconeogenese unverändert hoch war.

Der Verlauf des Glykogengehaltes innerhalb des Zeitraums der Gluconeogeneseinkubationen zeigte bei den Hungerrattenhepatozyten dieselben Charakteristiken, wie sie für die

Zellen vom gefütterten Tier zuvor beschrieben wurden (s. Kap. 3.1.1.5.): Unter basalen Inkubationsbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Glucosesupplementierung, wurde nur bei höheren Anfangswerten, etwa nach Ins/Dex, eine deutliche Abnahme gefunden, während in den übrigen Fällen, d.h. bei niedrigen Werten (< 5 µg/ml Protein) nur geringe Veränderungen beobachtet wurden. Unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (d.h. in Anwesenheit von Gluca + Pyr/Lac) zeigten die Glykogengehalte einen biphasischen Verlauf, d.h. eine Abnahme auch der niedrigen Ausgangswerte in der Anfangsphase der Inkubation und einen Wiederanstieg im weiteren Verlauf, der bei besonders aktiver Gluconeogenese, z.B. nach Dex- und Dex/Gluca-Vorbehandlung, zu Glykogenspiegeln führte, die über den Ausgangswerten lagen.

Die zuvor beschriebenen Veränderungen der zellulären Glykogenspiegel während der Inkubationsperioden finden allgemein auf sehr niedrigem Niveau (< 10 µg Glykogen/mg Protein) statt. Sie können mit der modifizierten Bestimmungsmethode empfindlich nachgewiesen werden, können jedoch im Hinblick auf eine Korrektur der Glucosebilanz gegenüber den Gluconeogenesewerten allgemein vernachlässigt werden, da sie mit einem Anteil von maximal einigen Prozent im Bereich der Meßungenauigkeit bei der Bestimmung der jeweiligen Glucosewerte liegen.

3.2. Gluconeogenese

3.2.1. Charakterisierung der gluconeogenetischen Kapazität

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Gluconeogenesekapazität von Rattenhepatozyten während mehrtägiger Primärkultur. Zur Bestimmung der Fähigkeit zur Gluconeogenese wurden Inkubationsbedingungen gewählt, die den Kulturbedingungen nahekommen: Serumhaltiges W/AB-77-Medium ohne Oleat-, Pyruvat/Lactat- und Glucosesupplementierung bildete die Basis für das Inkubationsmedium. Unter allen Inkubationsbedingungen (Basismedium ± Hormon- ± Substratsupplemente) standen daher die Aminosäuren des Mediums als Substrate für die Gluconeogenese zur Verfügung; unter basalen Bedingungen, d.h. in Abwesenheit supplementierten Pyruvat/Lactats, bildeten diese Aminosäuren die Hauptsubstrate für die Gluconeogenese. Die Bildung von Harnstoff, die ein Maß für den Gesamtumsatz der Aminosäuren darstellt, wurde an unterschiedlich vorbehandelten oder inkubierten Zellen parallel zur Glucosebilanz ermittelt; neben einer allgemeinen Charakterisierung der Hepatozyten im Hinblick auf die Aufrechterhaltung dieser leberspezifischen Funktion und deren Beeinflußbarkeit durch Vorbehandlung und Inkubationsbedingungen ermöglichen diese Ergebnisse beim Vergleich mit Glucosebilanz und Lactatverbrauch eine qualitative Analyse des Beitrages der Aminosäuren zur Gluconeogenese.

3.2.1.1. Zeitlicher Verlauf der Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Bedingungen während 24-stündiger Inkubation

Im Rahmen der Untersuchungen zur Gluconeogenese wurden die kultivierten Hepatozyten jeweils 21,5 h lang inkubiert und anschließend die in dieser Zeit gebildete Glucose gemessen.

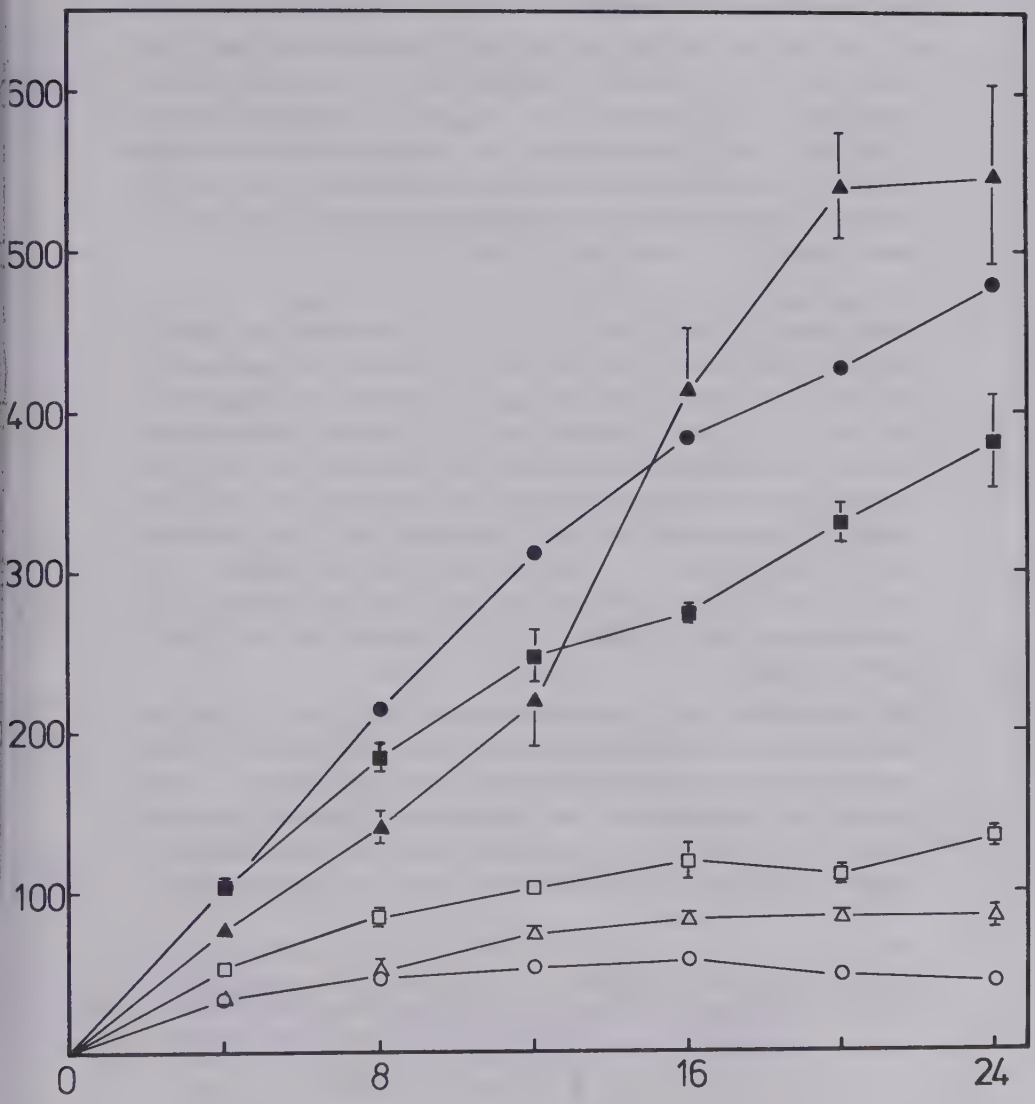
Eine solch lange Inkubationsperiode wurde vor allem aus folgenden Gründen gewählt: Unter diesen Bedingungen können kurzfristige störende Einflüsse, wie die beim Wechsel auf Inkubationsbedingungen durch Waschprozedur (s. Kap. 2.6.4.) und Medienwechsel bedingten Temperatur- und pH-Schwankungen, vernachlässigt werden, die sich bei kurzen Inkubationszeiten vergleichsweise stärker auswirken müßten. Außerdem konnte so der Anteil, den Änderungen im zellulären Glykogenspiegel zur Glucosebilanz beitragen, gering gehalten werden: Die in der Anfangsphase der Inkubation besonders ausgeprägte Glykogenolyse (s. Kap. 3.1.1.5., Abb. 1) würde bei hohem Glykogengehalt und kurzer Inkubationszeit einen beträchtlichen, zu korrigierenden Anteil an der gesamten Glucosefreisetzung ausmachen, während dieser Beitrag im Rahmen der hier gewählten langen Inkubationsperiode aufgrund des beobachteten Verlaufs der Glykogenspiegel gegenüber der Gluconeogenese vergleichsweise gering ist.

Wie die im folgenden beschriebenen Ergebnisse zum Verlauf der Glucosebilanz während 24-stündiger Inkubation zeigen, ist der gewählte Inkubationszeitraum zur Analyse von Hormoneinflüssen auf die Gluconeogenese geeignet. Unter bestimmten Bedingungen scheint eine solche längere Inkubationszeit für die volle Ausprägung des Einflusses der Hormonvorbehandlung auf die Gluconeogenesekapazität der Zellen erforderlich zu sein: In Abb. 2 ist bei Dexamethason-vorbehandelten Hepatozyten von gehungerter Ratte am 2. Tag ein ausgeprägter sigmoider Verlauf der stimulierten Gluconeogenese zu er-

---

Abb. 2: Zeitlicher Verlauf von basaler und stimulierter Gluconeogenese während 24-stündiger Inkubation nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung (Hepatozyten von gehungerter Ratte; 2. Tag)

Kultivierung: ○,● : Kontrolle; □,■ : Glucagon (10^{-7} M); △,▲ : Dexamethason (10^{-7} M)
Inkubation: offene Symbole: basale Bedingungen; geschlossene Symbole: stimulierende Bedingungen (Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM))
(N = 3: Gluca, Dex; N = 2: Kontrolle)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein
Ordinate: Inkubationszeit (h)


600
500
400
300
200
100
0
8
16
24

kennen; offenbar müssen hier zeitaufwendige Prozesse ablaufen, ehe es zur maximalen Gluconeogenese kommen kann.

Die Abbildungen 2-4 zeigen den zeitlichen Verlauf der Glucosebilanz bei kultivierten Hepatozyten vom gefütterten bzw. gehungerten Tier während einer jeweils 24-stündigen Inkubation unter identischen basalen bzw. stimulierenden Bedingungen nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung. Die Werte wurden um die jeweiligen Glykogenänderungen während der Inkubationsperiode korrigiert (s. Kap. 2.6.4.).

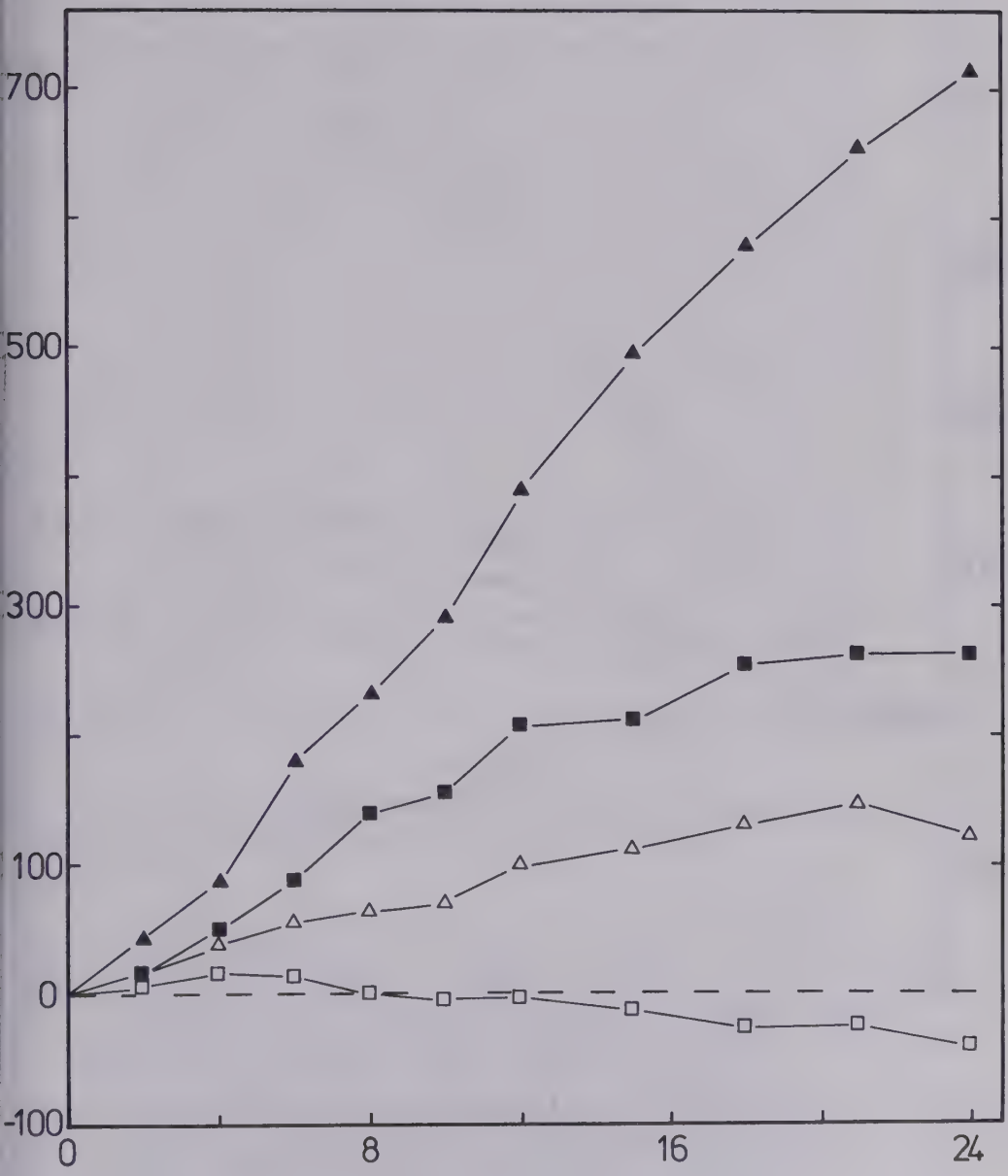
Bei Hepatozyten vom gehungerten Tier wird unter stimulierenden Bedingungen (Glucagon + Pyr/Lac) während der gesamten Inkubationszeit eine Zunahme der Glucose beobachtet, deren Anstieg nach einer nur wenig ausgeprägten Anlaufphase über ca. 12 h linear verläuft und sich danach in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung unterschiedlich stark verlangsamt. Nach Vorbehandlung mit Dex verläuft die Glucosebildung innerhalb des üblichen Zeitraums von 21,5 h weitgehend linear (Abb. 3); in der Anfangsphase der Kultur scheint für die volle Ausprägung des Einflusses der Hormonvorbehandlung eine längere Zeit erforderlich zu sein, so daß ein sigmoider Verlauf resultiert (Abb. 2).

Bei Hepatozyten von gefütterter Ratte wird unter stimulierenden Inkubationsbedingungen nach Vorbehandlung mit Gluconeogenese-stabilisierenden Hormonbedingungen, hier in Anwesenheit von Dexamethason und Dexamethason/Insulin, ein weitgehend ähnlicher Verlauf mit einem nach der Anfangsphase linearen Anstieg bis ca. 12 h und einem darauffolgenden ge-

---

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf von basaler und stimulierter Gluconeogenese während 24-stündiger Inkubation nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung (Hepatozyten von gehungerter Ratte; 3. Tag)

Kultivierung: □,■ : Insulin (23 mU/ml); △,▲ : Dexamethason (10^{-6} M)
Inkubation: offene Symbole: basale Bedingungen; geschlossene Symbole: stimulierende Bedingungen (Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein
Ordinate: Inkubationszeit (h)


700
500
300
100
0
-100
0
8
16
24

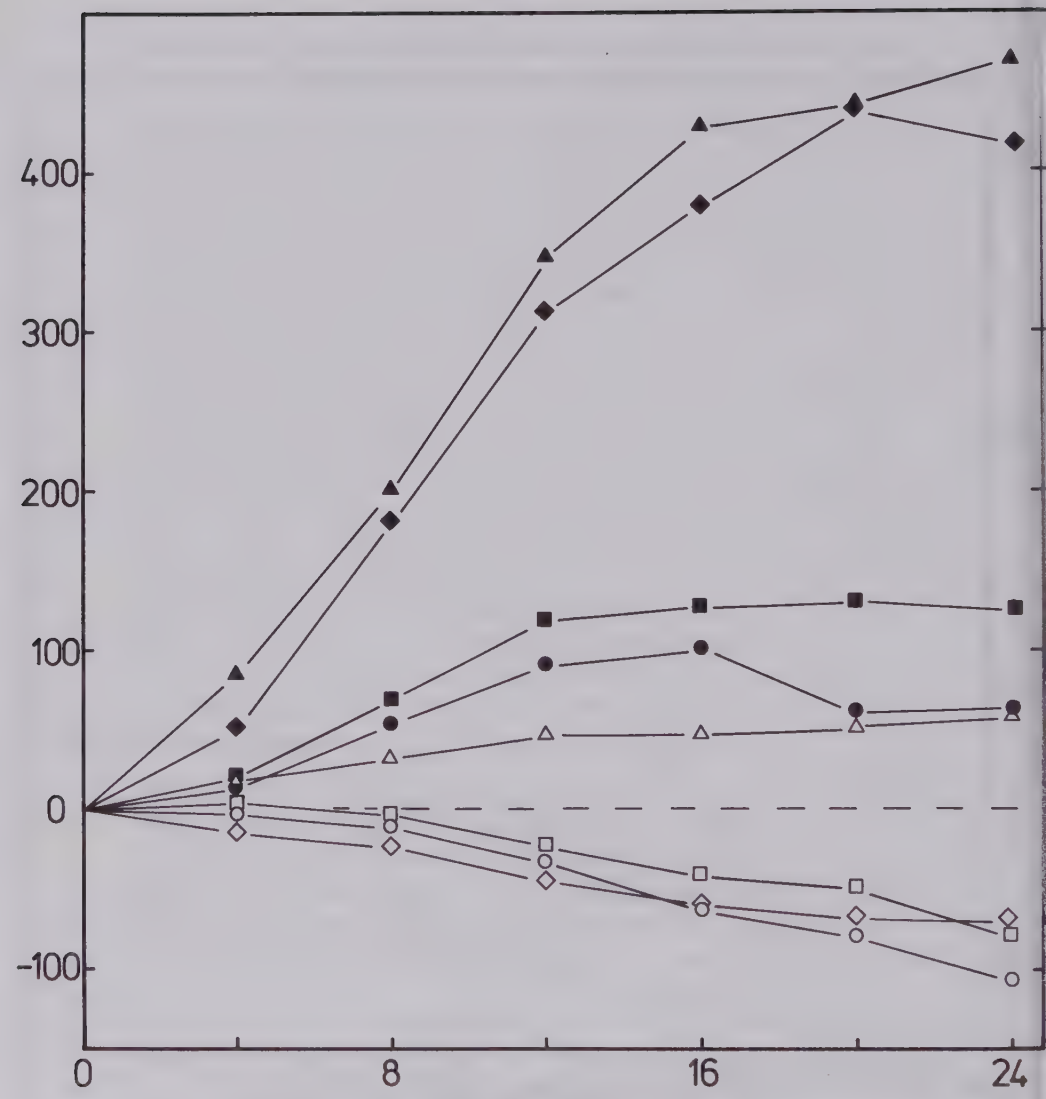


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Bedingungen während 24-stündiger Inkubation (Hepatozyten von gefütterter Ratte; 3. Tag)

Kultivierung: ○,● : Kontrolle; □,■ : Insulin (23 mU/ml); △,▲ : Dexamethason (10^{-6} M); ◇,◆ : Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M)
Inkubation: offene Symbole: Kontrolle (basale Glucosebilanz); geschlossene Symbole: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM) (N = 2 (Kulturschalen))
Abszisse: µg Glucose/mg Protein
Ordinate: Inkubationszeit (h)

ringeren Anstieg gefunden (Abb. 4), mit nur geringen Änderungen am Ende der üblichen Inkubationsperiode. Nach Kultivierung unter nicht-stabilisierenden Bedingungen wird nach ca. 12 h eine Plateauphase erreicht, die für den Rest des üblichen Inkubationszeitraumes (21,5 h) erhalten bleibt (Ins) bzw. leicht zurückgehen kann (Kontrolle), siehe Abb. 4. In W/AB-77 Medium unter basalen Inkubationsbedingungen, d.h. ohne Supplementierung von Glucose, Pyr/Lac und Gluca, stellen die nach 21,5 h gemessenen Werte im Falle positiver Glucosebilanz (nach Dex, s. Abb. 2, 3, 4, oder K, Gluca am 2. Tag) im allgemeinen Plateauwerte dar, die nach 12 - 16 h erreicht werden, während sie im Falle der negativen Glucosebilanz einer Phase der etwa linearen Glucoseaufnahme entsprechen, die einer Anfangsphase mit geringer Aufnahme (Abb. 4) oder Abgabe (Abb. 3) folgt.

Aufgrund des zu beobachtenden weitgehend gleichförmigen Verlaufs der Glucosebilanzen nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung und an verschiedenen Kulturtagen erscheint eine Inkubationsperiode von 21,5 h zur Bestimmung hormoneller Einflüsse auf die Gluconeogenesekapazität der Zellen, insbesondere unter stimulierenden Inkubationsbedingungen, als geeignet.

3.2.1.2. Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen auf Glucosebilanz und Harnstoffsynthese

Im Rahmen der Untersuchung hormoneller Einflüsse auf die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten wurden die Zellen im allgemeinen unter basalen oder stimulierenden Bedingungen, d.h. in An- oder Abwesenheit von Glucagon plus Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM) inkubiert. Zur näheren Charakterisierung des Einflusses der Hormon- und Substratkomponente wird im folgenden der Verlauf von Harnstoffsynthese und Glucosebilanz bei Inkubation unter ± Glucagon ± Pyruvat/Lactat während mehrtägiger Kultur von Hepatozyten aus gefütterter und gehungerter Ratte gegenübergestellt.

3.2.1.2.1. Hepatozyten von gehungertem Tier

Die Abb. 5 und 6 zeigen den Verlauf von Harnstoffsynthese bzw. Glucosebilanz für identisch vorbehandelte Zellen unter dem Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen: Hepatozyten von gehungerter Ratte wurden vom Zeitpunkt des Absetzens an unter Insulin/Dexamethason kultiviert und an den einzelnen Kulturtagen in Anwesenheit dieser Hormone unter ± Glucagon ± Pyruvat/Lactat jeweils 21,5 h lang inkubiert (s. 3.2.1.1.). Da Ins/Dex durchgehend anwesend war, wurde auf die übliche Waschprozedur am Beginn der Inkubationsperioden (zum Entfernen von Hormonresten, s. 2.6.4.) verzichtet; aufgrund des Glucosegehaltes verbliebener Reste des Kulturmediums sowie des Serumanteils des Inkubationsmediums (s. Kap. 2.6.4.) lagen die Glucosekonzentrationen zu Beginn der Inkubationen bei ca. 1 mM.

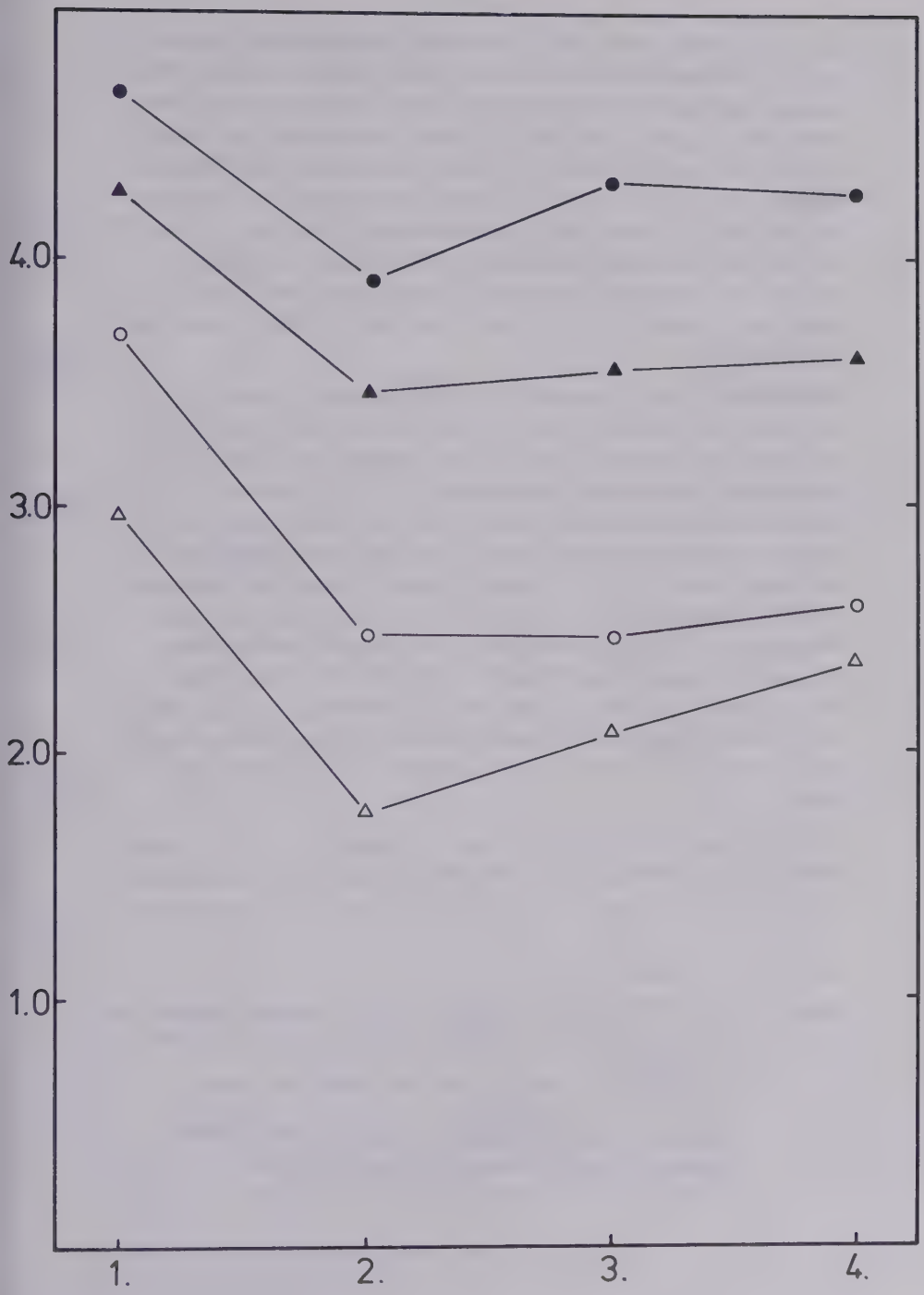
Wie aus Abb. 5 hervorgeht, zeigen die Hepatozyten in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen deutliche Unterschiede in der Harnstoffsynthese. Während der gesamten Kulturdauer gilt die Reihenfolge: Pyr/Lac < Kontrolle < Gluca + Pyr/Lac < Gluca. Glucagon zeigt also durchgehend einen stimulierenden Effekt, während in Anwesenheit von Pyr/Lac sowohl die basale, als auch die glucagonstimulierte Harnstoffbildung vermindert ist.

Die Harnstoffproduktion der inkubierten Hepatozyten geht zwischen dem 1. und 2. Kulturtag allgemein zurück, die Abnahme ist jedoch unter den einzelnen Inkubationsbedingungen

---

Abb. 5: Einfluß unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Harnstoffsynthese während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M)
Inkubation: ○: Kontrolle; △: Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) ●: Glucagon (10^{-6} M); ▲: Gluca + Pyr/Lac (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Alle Inkubationen wurden in Anwesenheit von Ins/Dex durchgeführt.
Abszisse: µMol Harnstoff/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kulturdauer (1. - 4. Tag)


4.0
3.0
2.0
1.0
1.
2.
3.
4.

deutlich verschieden: Ein besonders ausgeprägter Rückgang ist in Abwesenheit von Glucagon, d.h. unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Pyr/Lac zu beobachten. Zwischen dem 2. und 4. Kulturtag werden weitgehend unveränderte bis eher ansteigende Werte für die Harnstoffsynthese gefunden. Am 4. Tag zeigen die Zellen zwischen 70 % (Kontrolle) und 90 % (Gluca) der entsprechenden Werte vom 1. Tag. Hieraus ergibt sich eine Zunahme des stimulierenden Einflusses von Glucagon gegenüber den Basalwerten: Dieser beträgt am 1. Tag ca. 30 %, am 4. Tag ca. 70 % der jeweiligen Kontrollwerte.

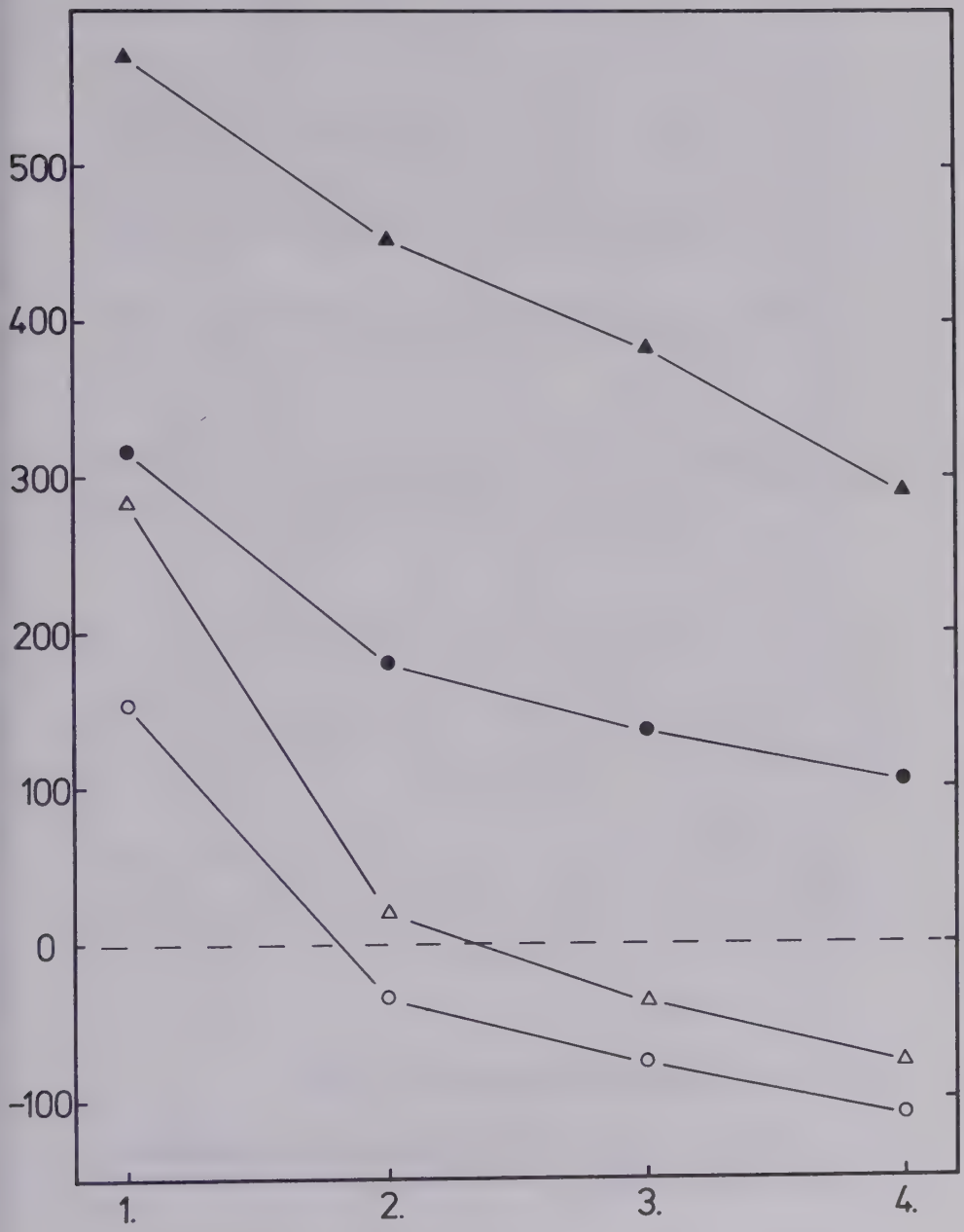
Im Gegensatz zu den vergleichsweise geringen Änderungen in der Harnstoffsynthese (Abb. 5) zeigen die Hepatozyten während einer 4-tägigen Kultivierung unter allen Inkubationsbedingungen deutliche Veränderungen in der Glucosebilanz, d.h. der Glucosesynthese bzw. -aufnahme, korrigiert um die jeweiligen Änderungen in den zellulären Glykogengehalten (s. Kap. 2.6.4.). Bei Inkubation unter Kontrollbedingungen (basale Glucosebilanz) wird nur am 1. Tag eine positive Glucosebilanz gefunden, während nach einem ausgeprägten Rückgang zwischen dem 1. und 2. Kulturtag in der Folge eine zunehmend negative Bilanz, d.h. Netto-Glucoseaufnahme, beobachtet wird; die Glucosekonzentration im Inkubationsmedium geht dabei am 4. Tag von anfangs 1 mM auf 0,3 mM zurück.

Unter stimulierenden Inkubationsbedingungen, d.h. in Anwesenheit von Glucagon plus Pyruvat/Lactat, nimmt die Gluconeogenese von einem Anfangswert, der dem ca. 4-fachen des

---

Abb. 6: Einfluß unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Glucosebilanz während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M)
Inkubation: ○: Kontrolle; △: Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) ●: Glucagon (10^{-6} M); ▲: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)


500
400
300
200
100
0
-100
1.
2.
3.
4.

Basalwertes zu diesem Zeitpunkt entspricht, bis zum 4. Tag annähernd linear auf ca. 50 % des Ausgangswertes ab.

In Anwesenheit von Pyruvat/Lactat wird am 1. Tag eine ca. 2-fach höhere Glucosebildung als unter Kontrollbedingungen gefunden. Der stimulierende Effekt des erhöhten Substratangebotes geht in der Folge deutlich zurück und führt in einem zur Kontrolle weitgehend parallelen Verlauf der Glucosebilanz zu einer gegenüber dieser verringerten Netto-Glucoseaufnahme.

Demgegenüber zeigen die Hepatozyten bei Inkubation in Anwesenheit von Glucagon während der gesamten Kulturdauer eine positive Glucosebilanz, wobei die Netto-Glucosebildung am 4. Tag etwa einem Drittel des Wertes vom 1. Tag entspricht. Bezogen auf die jeweiligen Basalwerte, bleibt die durch Glucagon bedingte Zunahme der Glucosebilanz zwischen dem 2. und 4. Kulturtag annähernd konstant und ist hier, im Gegensatz zum Effekt von Pyr/Lac, stärker ausgeprägt als am 1. Tag.

Über den Einfluß von Hormon- bzw. Substratkomponente des Inkubationsmediums ist zusammenfassend festzustellen, daß die alleinige Supplementierung mit Pyr/Lac nur am 1. Tag eine deutliche Stimulation der Glucosebildung bewirkt; hier werden ähnlich hohe Werte wie bei alleiniger Anwesenheit von Gluca erreicht. In der Folge übertrifft die Hormonwirkung den Substrateinfluß deutlich. Beim Vergleich mit dem Verlauf unter basalen und stimulierenden Bedingungen ergibt sich für die verschiedenen Inkubationsbedingungen durchgehend die folgende Reihenfolge in der Höhe der Glucosebilanz: K < Pyr/Lac < Gluca < Gluca + Pyr/Lac.

3.2.1.2.2. Hepatozyten vom gefütterten Tier

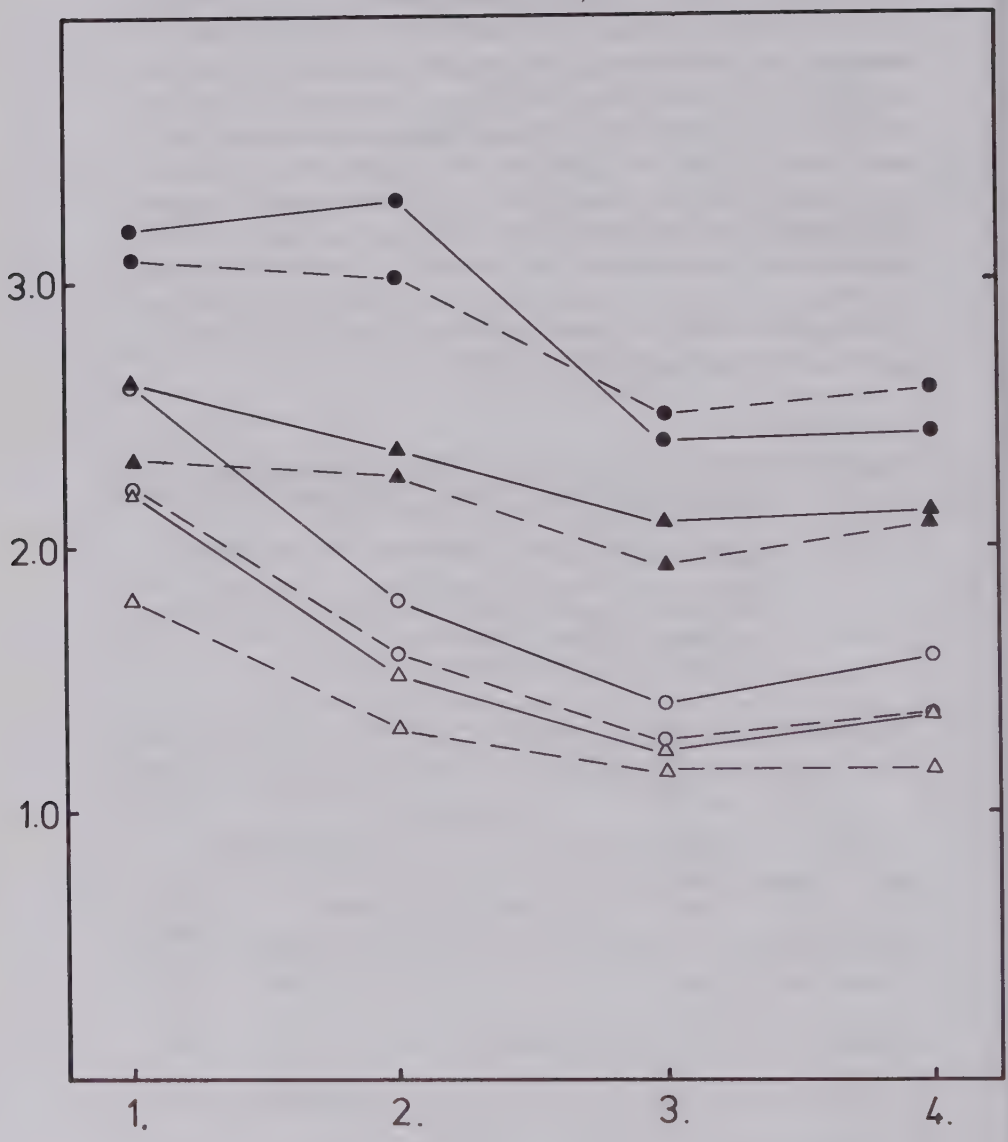
Eine entsprechende Gegenüberstellung von Harnstoffsynthese und Glucosebilanz unter verschiedenen Inkubationsbedingun-

gen, wie sie zuvor anhand der Abbildungen 5 und 6 für Hepatozyten aus gehungertem Tier vorgenommen wurde, erlauben Tabelle 4 und Abbildung 7 für den Fall analog kultivierter (Ins/Dex) und inkubierter (Ins/Dex, ± Gluca, ± Pyr/Lac) Hepatozyten von gefütterter Ratte. Neben dem einzelnen und gemeinsamen Effekt von Glucagon und Pyr/Lac wurde hierbei auch der Einfluß untersucht, den eine Supplementierung des glucosearmen Inkubationsmediums zu physiologischen Glucosespiegeln auf Glucosebilanz und Harnstoffsynthese unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ausübt; in unsupplementiertem Medium lag die Anfangskonzentration bei 1,3 mM, in supplementiertem Medium bei 6,3 mM.

Tabelle 4: Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen auf die Glucosebilanz während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Kultivierung: Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M)
Inkubation: Insulin/Dexamethason ± Glucagon (10^{-6} M) ± Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) ± Glucose (6,3 bzw. 1,3 mM, siehe Text)
±: Abgabe bzw. Aufnahme von Glucose

	µMol Glucose/mg Protein x 21,5 h							
	Inkubation							
	ohne Glucose				mit Glucose			
Zeit	Kontr.	Pyr/ Lac	Gluca	Gluca +Pyr/ Lac	Kontr.	Pyr/ Lac	Gluca	Gluca +Pyr/ Lac
1. Tag	-0,2	0,4	0,7	1,2	-1,0	-0,4	-0,4	0,4
2. Tag	-0,7	-0,2	0,1	0,7	-1,6	-0,6	-0,5	0,4
3. Tag	-0,7	-0,5	-0,3	0,6	-1,6	-0,7	-0,7	±0
4. Tag	-0,8	-0,5	-0,3	0,4	-1,6	-1,0	-1,1	-0,2


3.0
2.0
1.0
1.
2.
3.
4.

Wie aus dem Vergleich von Abb. 7 mit Abb. 5 hervorgeht, zeigen die Hepatozyten vom gefütterten Tier unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen (± Gluca, ± Pyr/Lac) einen qualitativ ähnlichen Verlauf der Harnstoffsynthese wie die Hepatozyten vom gehungerten Tier; die absoluten Werte liegen dabei im Falle der Hepatozyten vom gefütterten Tier in Abhängigkeit von der Kulturdauer und den Inkubationsbedingungen um zwischen 20 % und 40 % niedriger. In Anwesenheit von Pyruvat/Lactat ist die basale und glucagonstimulierte Harnstoffsynthese erniedrigt, so daß auch hier während der gesamten Kulturdauer die Reihenfolge gilt: Pyr/Lac < Kontrolle < Gluca + Pyr/Lac < Gluca.

In glucosesupplementiertem Inkubationsmedium (Abb. 7, unterbrochene Linien) wird unter den verschiedenen Bedingungen ein ähnlicher Verlauf der Harnstoffbildung wie in unsupplementiertem Medium beobachtet, die Werte liegen jedoch, mit Ausnahme von Glucagon + Pyruvat/Lactat am 3. und 4. Tag, durchweg niedriger; der senkende Einfluß der höheren Glucosekonzentration ist in Abwesenheit von Glucagon und während der ersten beiden Kulturtage besonders deutlich ausgeprägt.

In Abwesenheit von Glucagon im Inkubationsmedium (Kontrolle, Pyr/Lac) nimmt die Harnstoffbildung im Laufe der Kultur relativ stärker ab als in Anwesenheit von Glucagon (Gluca ± Pyr/Lac): In glucosearmem Medium (Abb. 7, durchgezogene Linien) geht sie bis zum 4. Tag auf ca. 60 % bzw. ca. 75 %

Abb. 7: Einfluß unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Harnstoffsynthese während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Kultivierung: Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M)
Inkubation: ○: Kontrolle; △: Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM) ●: Glucagon (10^{-6} M); ▲: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
——: Inkubation in Medium ohne Glucosesupplementierung
---: Inkubation in glucosesupplementiertem Medium

Abszisse: µMol Harnstoff/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)

der Werte vom ersten Tag zurück. Hieraus ergibt sich eine Zunahme des stimulierenden Effekts von Glucagon: In unsupplementiertem Medium steigt er von ca. 20 % am 1. Tag auf ca. 55 % am 4. Tag an, in glucosesupplementiertem Medium entsprechend von ca. 40 % auf 90 % der jeweiligen Kontrollen; bei Hepatozyten von gehungerter Ratte war eine Zunahme von ca. 30 % auf ca. 70 % beobachtet worden (s. Kap. 3.2.1.2.1.).

Im Gegensatz zu dem weitgehend ähnlichen Verlauf der Harnstoffsynthese unter dem Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen (Abb. 5 und 7) zeigen Hepatozyten vom gefütterten gegenüber Zellen vom gehungerten Tier unter denselben Bedingungen deutliche Unterschiede im Verlauf der Glucosebilanz (Abb. 6 und Tab. 4). Die Bilanz ist hier in glucosearmem Medium (Anfangskonzentration 1,3 mM) nur unter stimulierenden Bedingungen (Gluca + Pyr/Lac) während der gesamten Kulturdauer positiv; unter den übrigen Inkubationsbedingungen (K, Pyr/Lac, Gluca) kommt es zwischen dem 1. Tag (Kontrolle) und 3. Tag (Gluca) zur Netto-Glucoseaufnahme aus dem Medium. In glucosesupplementiertem Inkubationsmedium (Anfangskonzentration 6,3 mM) wird insgesamt eine starke Verschiebung der Glucosebilanz in Richtung Glucoseaufnahme beobachtet; eine Netto-Glucoseproduktion wird hier nur unter stimulierenden Bedingungen (Gluca + Pyr/Lac) und nur während der ersten beiden Kulturtage gefunden. Die Differenz zwischen den Bilanzen bei Inkubation unter Pyruvat/Lactat bzw. Glucagon ist in glucosesupplementiertem Medium wegen der Meßungenauigkeit (kleine Differenzen vor hohem Hintergrund) nicht signifikant; das Ergebnis in glucosearmem Medium zeigt jedoch, daß in Anwesenheit von Glucagon während der gesamten Kulturdauer eine im Vergleich zur alleinigen Zugabe von Pyruvat/Lactat höhere Glucosesynthese bzw. verringerte Glucoseaufnahme stattfindet, d.h. daß die hormonelle Wirkung den Einfluß des erhöhten Substratangebots übertrifft. Wie bei den Hepatozyten vom gehungerten Tier gilt also auch hier für die Höhe der Glucosebilanz: K < Pyr/Lac < Gluca < Gluca + Pyr/Lac.

Beim Vergleich der Glucosebilanz von Hepatozyten aus gefüttertem und gehungertem Tier erscheint neben den bei Hepatozyten vom gefütterten Tier insgesamt deutlich geringeren bzw. zur Glucoseaufnahme verschobenen Werten, insbesondere dem geringeren stimulierenden Einfluß von Glucagon, die Beobachtung bemerkenswert, daß unter Kontrollbedingungen in glucosearmem und -supplementiertem Inkubationsmedium zwischen dem 2. und 4. Kulturtag eine gleichbleibend hohe Glucoseaufnahme beobachtet wird. Dies zeigt, daß Hepatozyten vom gefütterten Tier unter den angewandten Bedingungen, insbesondere der permanenten Anwesenheit von Ins/Dex, bereits von einem frühen Zeitpunkt an maximale Mengen an Glucose aufnehmen; in glucosearmem Inkubationsmedium wird die Aufnahme vermutlich durch die geringe insgesamt vorhandene Glucosemenge limitiert: am Ende der Inkubation wurden hier minimal 0,15 mM Glucose gemessen.

An dieser Stelle seien die Ergebnisse zum Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen (± Gluca, ± Pyr/Lac, ± Glucose) auf Harnstoffsynthese und Glucosebilanz bei Hepatozyten aus gefütterter und gehungerter Ratte kurz zusammengefaßt:

Während 4-tägiger Kultivierung unter Insulin/Dexamethason bleibt die Fähigkeit zur Harnstoffsynthese unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen bei Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier auf hohem Niveau erhalten (60 - 90 % der Ausgangswerte vom 1. Tag), insbesondere in Anwesenheit von Glucagon (Gluca ± Pyr/Lac). Unter denselben Kultur- und Inkubationsbedingungen findet gleichzeitig eine starke Veränderung der glykogen-korrigierten Glucosebilanzen in Richtung abnehmender Glucoseproduktion bzw. zunehmender Glucoseaufnahme statt; die weitestgehende Stabilisierung wurde hierbei bei Hepatozyten von gehungerter Ratte in Anwesenheit von Glucagon mit am 4. Tag 35 % (Gluca) bzw. 50 % (Gluca + Pyr/Lac) der jeweiligen Werte vom 1. Tag gefunden, während sowohl unter basalen Inkubationsbedingungen, als auch in Anwesenheit von Pyruvat/Lactat ab dem 1. Tag (Hepatozyten von gefütterter Ratte) bzw. 3. Tag (Hepatozyten

von gehungerter Ratte) eine negative Glucosebilanz beobachtet wurde.

Die Inkubation in glucosesupplementiertem an Stelle von glucosearmem Medium führt unter allen Bedingungen (± Gluca, ± Pyr/Lac) zu einer deutlichen Verschiebung der Glucosebilanzen in Richtung Glucoseaufnahme, während die Harnstoffsynthese gleichzeitig nur wenig beeinflußt wird (maximal 10 - 15 %). Der stimulierende Effekt der Inkubation mit Glucagon nimmt relativ zu den Kontrollbedingungen im Falle der Harnstoffproduktion im Laufe der Kultur deutlich zu (auf maximal ca. 70 % bei Hepatozyten von gehungerter Ratte), während die Wirkung dieses Hormons auf die Glucosebilanz annähernd konstant bleibt (Hepatozyten von gehungerter Ratte, Abb. 6) bzw. zurückgeht (Hepatozyten vom gefütterten Tier, Tab. 4).

Die Anwesenheit von Pyruvat/Lactat vermindert die basale und glucagonstimulierte Harnstoffproduktion, so daß für diese während der gesamten Kultivierungszeit gilt: Pyr/Lac < Kontrolle < Gluca + Pyr/Lac < Gluca. Auf die Glucosebilanz übt die alleinige Anwesenheit von Pyr/Lac einen nur geringen, am 1. Tag am deutlichsten ausgeprägten stimulierenden Einfluß aus (Abb. 6); in der Kombination mit Glucagon wird eine überadditive Wirkung auf die Glucosebilanz gefunden (Abb. 6). Für die Höhe der Glucosebilanz unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen gilt daher allgemein: Kontrolle < Pyr/Lac < Gluca < Gluca + Pyr/Lac (Abb. 6, Tab. 4).

3.2.2. Einfluß der Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die Relationen zwischen Glucosebildung, Lactatverbrauch und Harnstoffsynthese

Im vorangegangenen Kapitel wurde der Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen auf Harnstoffsynthese und Glucosebilanz von Hepatozyten beschrieben, die mehrere Tage unter identischen Hormonbedingungen (Ins/Dex) kultiviert wurden. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse von Untersuchungen an Hungerrattenhepatozyten dargestellt, bei denen der Einfluß der Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen auf Harnstoffsynthese, Lactatverbrauch und Glucosebilanz unter identischen, Gluconeogenese-stimulierenden Inkubationsbedingungen ermittelt wurde. Damit sollte einerseits die Wirkung einer unterschiedlichen Hormonvorbehandlung auf die längerfristige Beibehaltung der Fähigkeit zur Harnstoffsynthese im Vergleich mit deren Effekt auf die Glucosebilanz untersucht werden; daneben konnten aus der Gegenüberstellung von Höhe und Verlauf der "gluconeogenetischen Relationen" Lactatverbrauch:Glucosebildung bzw. Harnstoffsynthese:Glucosebildung, sowie über die Relation Harnstoff: Lactat Hinweise auf die relative Verwertung von Lactat bzw. Aminosäuren unter verschiedenen hormonellen Bedingungen gewonnen werden.

3.2.2.1. Kultivierung unter ± Dexamethason ± Glucagon

Hepatozyten von gehungerter Ratte wurden vom Absetzen an unter verschiedenen Hormonbedingungen kultiviert, die einen unterschiedlichen Einfluß auf die Beibehaltung der Fähigkeit zur Gluconeogenese ausüben (s. Kap. 3.2.3.2.): ± Dexamethason ± Glucagon (je 10^{-7} M); die Inkubationen (21,5 h) erfolgten unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen (Glucagon (10^{-6} M) plus Pyruvat/Lactat (1,5/15 mM)). In Tabelle 5 sind die Ergebnisse von Harnstoffbildung, Lactatver-

brauch und Glucosebilanz für den ersten und vierten Kulturtag gegenübergestellt.

Tabelle 5: Einfluß unterschiedlicher Hormonvorbehandlung auf Glucosebildung, Lactatverbrauch und Harnstoffsynthese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen bei Hepatozyten von gehungerter Ratte

Kultivierung: ± Glucagon ± Dexamethason (jeweils 10^{-7} M)
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abkürzungen: G: Glucosebildung; L: Lactatverbrauch; H: Harnstoffsynthese

Vorbehandlung	metabol. Leistung	Kultivierungszeit (Tage) 1	4
		µMol/mg Protein x 21,5 h	
Kontrolle	G	2,9	0,4
	L	9,2	5,5
	H	5,7	4,5
Gluca	G	3,8	0,2
	L	10,8	5,1
	H	7,0	4,2
Dex	G	3,6	1,6
	L	9,4	6,7
	H	5,6	4,0
Dex/Gluca	G	4,4	3,0
	L	10,6	9,5
	H	6,6	5,7

Wie aus der Tabelle hervorgeht, unterscheiden sich Harnstoffsynthese und Lactataufnahme in ihrem Verlauf deutlich von dem der Gluconeogenese: Während diese nach Kultivierung un-

ter Kontrollbedingungen und Glucagon bis zum 4. Tag drastisch abnimmt, hier auf 13 % bzw. 4 % der Werte vom 1. Tag, werden gleichzeitig noch 79 % bzw. 60 % der Harnstoffsynthese und 60 % bzw. 48 % des Lactatverbrauchs gefunden; nach Dexamethason- bzw. Dexamethason/Glucagon-Vorbehandlung wird eine Stabilisierung der Gluconeogenesekapazität beobachtet, hier bei 44 % bzw. 67 % der Werte vom 1. Tag; auch in diesen Fällen sind die Veränderungen von Harnstoffproduktion und Lactatverbrauch geringer als die der Glucosebilanz: am 4. Tag wurden 72 bzw. 71 % (Dex) und 86 bzw. 90 % (Dex/Gluca) der Anfangswerte gemessen.

Aus den unterschiedlichen Veränderungen ergibt sich eine Verschiebung der "gluconeogenetischen Relationen" von Harnstoffsynthese:Glucoseproduktion bzw. Lactatverbrauch:Glucoseproduktion zu höheren Werten: Nach Dex-Vorbehandlung steigen sie von 1,5 auf 2,5 (H:G) bzw. 2,6 auf 4,2 (L:G), nach Dex/Gluca-Kultivierung von 1,5 auf 1,9 (H:G) bzw. von 2,4 auf 3,2 (L:G) an, während sich diese Verhältnisse nach Kontroll- und Glucagonkultivierung von ähnlichen Ausgangswerten auf Werte > 10 verschieben.

Nach unterschiedlicher Hormonvorbehandlung zeigen sich also unter identischen stimulierenden Inkubationsbedingungen deutliche Unterschiede in den verschiedenen Stoffwechselleistungen: Während die Gluconeogenese sehr unterschiedlich stark abnimmt, bleiben Harnstoffsynthese und Lactatverbrauch im gleichen Zeitraum auf einem vergleichsweise höheren Niveau erhalten, das, in Abhängigkeit von den Hormonbedingungen während der Kultivierung, zwischen 60 und 86 % (H) bzw. 48 und 90 % (L) der Anfangswerte liegt.

3.2.2.2. Einfluß des Umsetzens von Glucagon auf Dexamethason

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse einer 5-tägigen Kultivierung unter Gluconeogenese-stabilisierenden Hormonbedingungen (Dex, Dex/Gluca) sowie nach Umsetzen von nichtstabilisierenden (Gluca) auf stabilisierende Bedingungen (Dex) dargestellt. Die Inkubationen (21,5 h) erfolgten unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen. Die Tabelle enthält die Gluconeogenesewerte bzw. die gluconeogenetischen Relationen Lactat(verbrauch):Glucose(bildung) und Harnstoff-(synthese):Glucose(bildung) für den 1., 3. und 5. Kulturtag, im Falle der zu verschiedenen Zeitpunkten (1. - 4. Tag) umgesetzten Zellen die entsprechenden Werte am 5. Kulturtag.

Die Kultivierung unter stabilisierenden Hormonbedingungen führt zu einem Verlauf von Glucosebilanz, Harnstoffsynthese und Lactatverbrauch bzw. der hier angegebenen Substratrelationen, wie er im Zusammenhang mit Tab. 5 bereits beschrieben wurde. Nach 5 Tagen beträgt die stimulierte Gluconeogenese nach Dex-Kultivierung 43 %, nach Dex/Gluca 68 % der Werte vom 1. Tag. Gleichzeitig liegen die Werte für die Harnstoffsynthese bei 60 bzw. 68 % und für den Lactatverbrauch bei 76 bzw. 98 % der Anfangswerte. Die Relation Lac: Gluc verschiebt sich damit im gleichen Zeitraum (s. Tab. 6) von 2,2 auf 3,8 (nach Dex) bzw. von 2,1 auf 3,0 (Dex/Gluca), während die Relation Harnstoff:Glucose von 1,2 auf 1,6 (Dex) ansteigt bzw. bei ca. 1,3 konstant bleibt (Dex/Gluca). Nach Kultivierung unter Dex/Gluca ist also die Gluconeogenese unter stimulierenden Substratbedingungen gegenüber Dex-Vorbehandlung auf höherem, der relative Verbrauch von Lactat und die relative Harnstoffproduktion gleichzeitig auf niedrigerem, den Anfangswerten ähnlichem Niveau erhalten.

Hepatozyten, die von Glucagon auf Dexamethason umgesetzt wurden, zeigen am 5. Tag, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Umsetzens, Unterschiede in der Gluconeogenesekapazität und in den gluconeogenetischen Relationen:
Wenn die Zellen bereits am 1. Tag, d.h. beim ersten Medien-

Tabelle 6: Vergleich des Einflusses von kontinuierlicher und sequentieller Hormonvorbehandlung auf Glucosebildung, Lactatverbrauch und Harnstoffsynthese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen bei Hepatozyten von gehungerter Ratte

Angaben: in µMol/mg Protein x 21,5 h (G) bzw. µMol:µMol (L:G; H:G)
Kultivierung: Dexamethason, Glucagon: 10^{-6} M
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abkürzungen: G: Glucosebildung; L: Lactatverbrauch; H: Harnstoffsynthese; I-IV: Zeitpunkt des Umsetzens (1. - 4. Tag)

	Kultivierungszeit (Tage)								
	1			3			5		
Vorbehandlung	G	L:G	H:G	G	L:G	H:G	H	L:G	H:G
Dex	4,4	2,2	1,2	3,0	2,6	1,3	1,9	3,8	1,6
Dex/Gluca	4,2	2,1	1,3	2,9	2,8	1,2	2,9	3,0	1,3
Gluca → Dex I							2,0	3,7	1,6
II							3,0	3,0	1,5
III							2,3	3,3	2,0
IV							1,4	4,0	2,9

wechsel, nach 5 Stunden in der Kultur, umgesetzt wurden, so stimmen Glucosebilanz und Substratrelationen mit den Ergebnissen an durchgehend unter Dex kultivierten Zellen weitgehend überein. Wurde die Umsetzung am 2. Tag vorgenommen, so werden nach 5 Tagen sowohl höhere Glucosewerte, als auch niedrigere Relationen Lac:Gluc bzw. Harnstoff:Gluc gefunden; diese Ergebnisse entsprechen weitgehend denen nach durchgehender Kultivierung unter Dex/Gluca. Eine Umsetzung am 3. Tag führt zu einer höheren Glucoseproduktion gegenüber

durchgehend unter Dex kultivierten Hepatozyten; gleichzeitig ist die Substratrelation Lac:Gluc erniedrigt und die Relation Harnstoff:Gluc erhöht. Wurden die Zellen erst am 4. Tag, d.h. nach 72 Stunden in der Kultur, umgesetzt, so werden am 5. Tag eine deutlich geringere Gluconeogenese und erhöhte Substratrelationen gefunden. Nach dem Umsetzen von Glucagon auf Dexamethason kommt es also zu einer zeitabhängigen Annäherung an die hohen Gluconeogenesewerte und niedrigen Substratrelationen, wie sie bei durchgehender Kultivierung unter Dex bzw. Gluca/Dex gefunden werden.

Bei gemeinsamer Betrachtung der Ergebnisse in Tab. 5 und 6 ist festzustellen, daß die Hepatozyten durch verschiedene Hormonvorbehandlungen (± Dex ± Gluca) im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur Harnstoffproduktion und Lactatmetabolisierung unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (Gluca + Pyr/Lac) deutlich weniger beeinflußt werden als in ihrer Fähigkeit zur Gluconeogenese. Nach 4-tägiger Kultivierung wurden für die Harnstoffproduktion zwischen 60 % (Gluca) und 86 % (Gluca/Dex-Vorbehandlung), für den Lactatverbrauch zwischen 48 % (Gluca) und 90 % (Dex/Gluca) der Werte vom 1. Tag gefunden, während die Gluconeogenese gleichzeitig auf Werte zwischen 4 % (Gluca) und 67 % (Dex/Gluca) zurückging. Hieraus ergibt sich in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung ein sehr unterschiedlicher Verlauf der gluconeogenetischen Relationen: Am 1. Tag liegt die Relation Lactat(verbrauch): Glucose(produktion) nur relativ wenig über dem theoretischen Substrat:Produkt-Verhältnis der Gluconeogenese: Tab. 6: 2,1 2,2 (Dex, Dex/Gluca) und Tabelle 5: 2,6 - 3,2 (± Dex ± Gluca). Mit zunehmender Kulturdauer verschiebt sich dieses Verhältnis in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung unterschiedlich stark zu höheren Werten: Unter Glucagon/Dexamethason steigt die Relation auf ca. 3, unter Dexamethason auf ca. 4 an (Tab. 5 und 6), während nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen oder Glucagon ein Anstieg auf deutlich > 10 beobachtet wird (Tab. 5).

Die Relation Harnstoff(synthese):Glucose(produktion) liegt am 1. Tag bei < 2, siehe Tab. 5 und 6: 1,2 - 2,0 (± Dex

± Gluca). Auch dieses Verhältnis ändert sich unter Dexamethason/Glucagon und Dexamethason nur wenig, siehe Tabelle 5 und 6: 1,2 - 1,9 (Dex, Dex/Gluca), während es nach Kontroll- und Glucagon-Kultivierung am 4. Tag, ebenso wie die Lactat: Glucose-Relation, bei > 10 liegt (Tab. 5). Beim Umsetzen von Glucagon auf Dexamethason kommt es zu einer Abnahme der Substratrelationen und einer zeitabhängigen Annäherung an die entsprechenden Relationen unter Dexamethason bzw. Glucagon/Dexamethason (Tab. 6).

Die drastischen Veränderungen der Substratrelationen bei Kontroll- und Glucagon-Vorbehandlung kommen jeweils aufgrund der starken Abnahme der Gluconeogenese bei gleichzeitig vergleichsweise geringem Rückgang von Lactatverbrauch und Harnstoffsynthese zustande, siehe Tab. 5. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß unter diesen Bedingungen eine vorrangige Metabolisierung von Lactat und Aminosäuren in Stoffwechselbereichen außerhalb von Gluconeogenese und Glykogensynthese stattfinden, während nach Dexamethason- und Dexamethason/Glucagon-Vorbehandlung eine bevorzugte Verwendung für die Gluconeogenese stattfindet.

Der Beitrag, den die Aminosäuren des Mediums zur Glucosebildung unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (Gluca + Pyr/Lac) leisten, wurde nicht direkt bestimmt. Der Anteil läßt sich aus der Harnstoffsynthese berechnen, wenn der stöchiometrische Faktor für die Umrechnung von Harnstoff in Glucose bekannt ist. Dieser Faktor hängt allgemein von der Zusammensetzung und Metabolisierung einer Aminosäurenmischung ab und kann für die hier verwendete Zusammensetzung aufgrund der Untersuchungen von Gebhardt (47) zum Metabolismus der einzelnen Aminosäuren des verwendeten W/AB-77-Mediums abgeschätzt werden. Nach diesen Untersuchungen werden die glucoplastischen Aminosäuren, vor allem die N-reichen Komponenten His, Arg und Gln, die einen hohen Anteil (ca. 30 %) des gesamten Aminosäuregehaltes des Mediums ausmachen, von den kultivierten Hepatozyten in besonders hohem Ausmaß metabolisiert. Bei Verwendung der dort (47) angegebenen Daten (für eine 24-stündige Inkubation in Anwesenheit von De-

xamethason) ergibt sich ein Faktor von 0,5 für die Umrechnung von Harnstoffsynthese in maximal mögliche Glucoseproduktion. Dieser Wert entspricht dem Umrechnungsfaktor für die stöchiometrische Bildung von Glucose aus Lactat. Die Relation Harnstoffsynthese:Lactatverbrauch sollte deshalb direkt dem Verhältnis der Gluconeogenese aus Aminosäuren und Lactat entsprechen, vorausgesetzt, daß gluconeogenetische Substrate aus dem Aminosäureabbau in gleichem Ausmaß wie Lactat/Pyruvat in die Gluconeogenese bzw. sonstige Stoffwechselwege eingeschleust werden.

Die Relation Harnstoffbildung:Lactatverbrauch zeigt unter identischen Inkubationsbedingungen (Gluca + Pyr/Lac) in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung einen bemerkenswert unterschiedlichen Verlauf: Am 1. Tag beträgt die Harnstoffbildung allgemein, d.h. nach ± Dexamethason ± Glucagon-Vorbehandlung, ca. 60 % des Lactatumsatzes, siehe Tabelle 5 und 6; nach obigem Umrechnungsfaktor bedeutet dies einen möglichen Anteil der Gluconeogenese aus Aminosäuren von 60 % der Lactat-Gluconeogenese bzw. ca. 40 % der gesamten Gluconeogenese (Lactat + Aminosäuren). Unter Dexamethason bzw. Dexamethason/Glucagon, d.h. Hormonbedingungen, welche die Gluconeogenese stabilisieren, bleibt die Relation im Laufe einer längerfristigen Kultivierung auf dieser Höhe (Tab. 5: 60 % am 4. Tag) oder geht zurück (Tab. 6: 43 % am 5. Tag nach Dex und Dex/Gluca), während sie unter nicht-stabilisierenden Bedingungen (Kontrolle, Gluca) ansteigt: Von 62 % auf 81 % (Kontrolle) bzw. von 65 % auf 82 % (Gluca) am 4. Tag, siehe Tab. 5. In Analogie hierzu kommt es im Umsetzexperiment von Tab. 6 mit zunehmender Dauer nach dem Umsetzen von Glucagon auf Dexamethason zu einer Abnahme des Verhältnisses von Harnstoff:Lactat: von 71 % bei den zuletzt (4. Tag) umgesetzten Zellen nimmt die Relation über 60 % (3. Tag) und 49 % (2. Tag) auf 43 % bei den am 1. Tag umgesetzten Zellen ab, einem Wert, der dem von durchgehend unter Dexamethason kultivierten Zellen entspricht.

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Aminosäuremetabolismus in Hepatozyten, die unter Kontrollbedingungen oder Glucagon kultiviert wurden, relativ zum Lactatumsatz mit der Kultivierungszeit zunimmt, während nach Dexamethason und Dexamethason/Glucagon-Vorbehandlung ein unveränderter bis verminderter relativer Umsatz zu beobachten ist. Dies läßt auf einen verstärkten Aminosäure-katabolen Zustand der Zellen in Abwesenheit von Dexamethason schließen, der eine veränderte Stickstoffbilanz anzeigt; dieser Zustand kann, wie die Umsetzversuche zeigen, auch nach mehrtägiger Kultivierung unter Glucagon durch Dexamethason-Behandlung rückgängig gemacht werden. Diese Interpretation steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gebhardt (47) zur Stickstoffbilanz der kultivierten Hepatozyten unter ± Dexamethason. An den ersten beiden Kulturtagen war in Abwesenheit von Dex eine tendenziell negative, in Anwesenheit dieses Hormons eine positive Stickstoffbilanz, vor allem aufgrund einer verstärkten Aminosäureaufnahme, gefunden worden.

3.2.3. Einfluß der kontinuierlichen Vorbehandlung mit verschiedenen Hormonen auf die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier

Die Wirkung der in vivo für den Glucosemetabolismus bedeutsamen Hormone Insulin, Glucagon und Glucocorticoid (Dexamethason) auf den gluconeogenetischen Status, d.h. die Fähigkeit zur Gluconeogenese unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen, wurde an Hepatozyten aus gefütterter und gehungerter Ratte während mehrtägiger Kultivierung untersucht.

3.2.3.1. Einfluß der Vorbehandlung mit Insulin

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen den Einfluß der Vorbehandlung ± Insulin (23 mU/ml) in Anwesenheit von Dexamethason (10^{-6} M) auf den Verlauf von basaler und stimulierter Gluconeogenese bei Hepatozyten von gefüttertem bzw. gehungertem Tier während 4-tägiger Kultur. Die Inkubationen (21,5 h) erfolgten in Abwesenheit von Ins und Dex im Anschluß an die in Kap. 2.6.4. beschriebene Waschprozedur. Die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse wurden um die jeweiligen Änderungen der Glykogenspiegel korrigiert (siehe Kap. 2.6.4.).

Unter basalen Inkubationsbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Glucosesupplementierung (Anfangskonzentration: 0,4 mM Glucose), wird am 1. Tag nach ± Ins-Vorbehandlung (6 h) in beiden Fällen (Abb. 8 und 9) keine signifikante Differenz in der Glucosebilanz gefunden; die Werte für die basale Gluconeogenese liegen zu diesem Zeitpunkt bei Zellen vom gehungerten Tier ca. 2-fach höher als bei Hepatozyten von gefütterter Ratte. In der Folge nimmt die Glucosebildung unter basalen Inkubationsbedingungen unterschiedlich stark ab: Während nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen (Dexamethason) am 4. Tag in beiden Fällen eine positive Glucosebilanz gefunden wird, wobei ca. 20 % der jeweiligen Werte vom 1. Tag gemessen werden, wird nach Vorbehandlung mit Insulin jeweils eine deutlich geringere Glucosebildung bzw. verstärkte Glucoseaufnahme beobachtet, so daß bei Hepatozyten von gefütterter Ratte bereits ab dem 2. Tag, bei Hepatozyten vom gehungerten Tier am 4. Tag, eine negative Glucosebilanz, d.h. eine Netto-Glucoseaufnahme ermittelt wird. Im Falle der Insulin-vorbehandelten Hepatozyten geht die Glucosekonzentration im Inkubationsmedium am 3. und 4. Tag von anfangs 0,4 mM auf < 0,1 mM zurück.

Im Vergleich zu der nach Insulin-Vorbehandlung deutlich verringerten bzw. zur Glucoseaufnahme verschobenen Glucosebilanz unter basalen Inkubationsbedingungen ist der suppres-

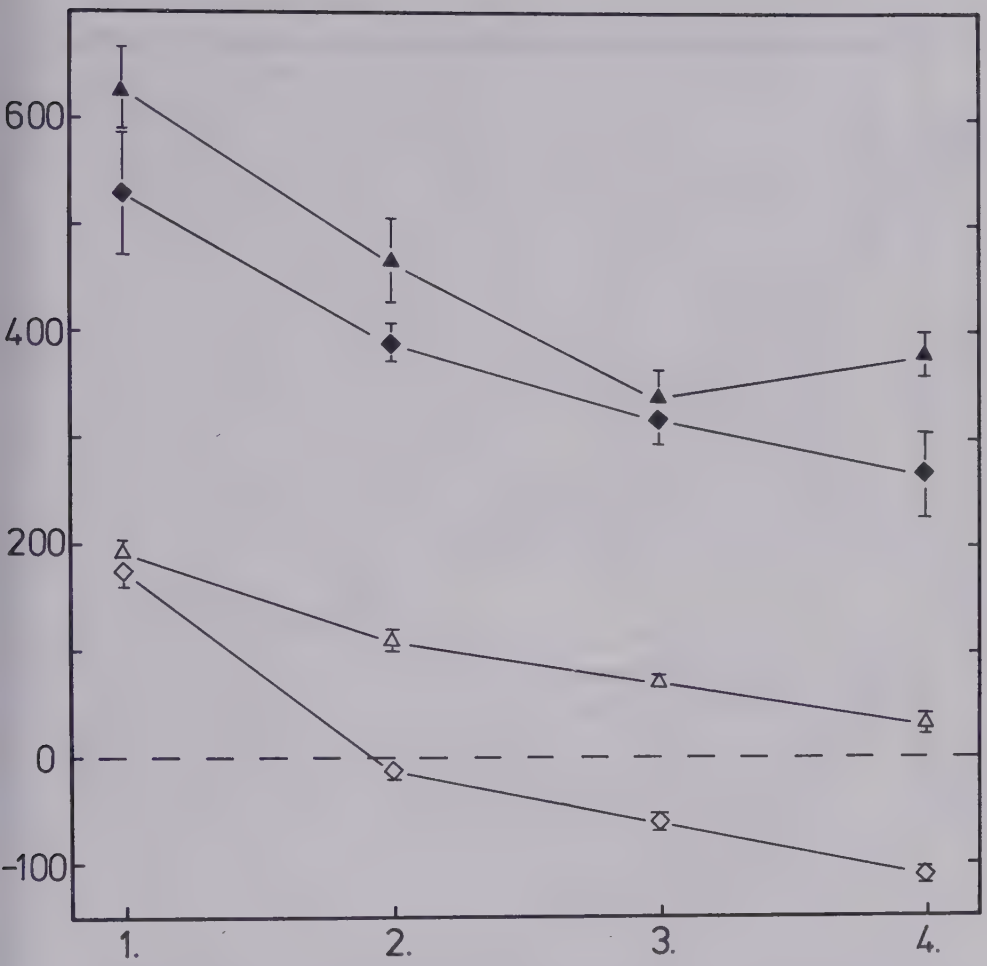
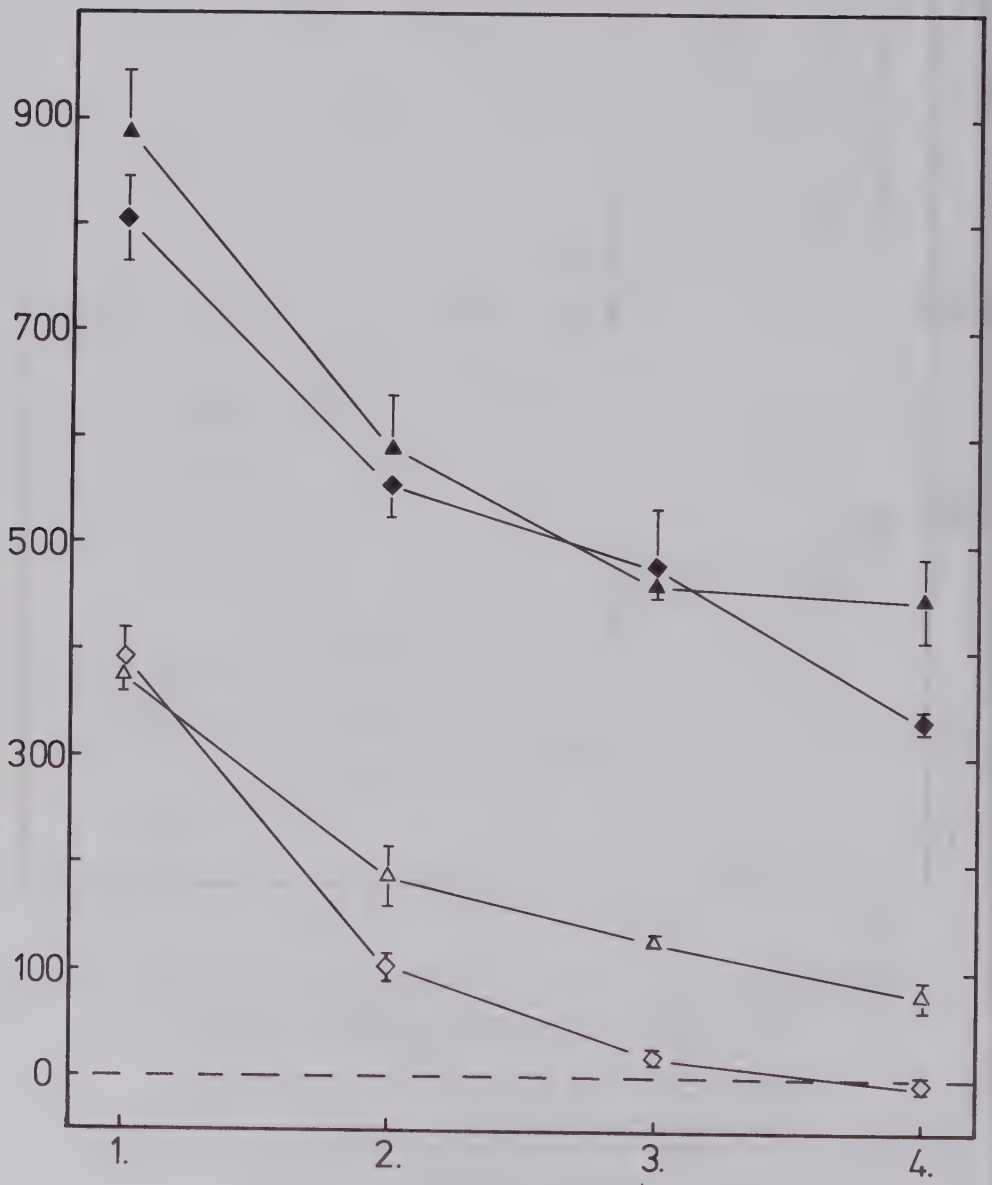


Abb. 8: Einfluß der Vorbehandlung mit Insulin auf die Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Kultivierung: △,▲ : Kontrolle; ◇,◆ : Insulin (23 mU/ml). Die Kultivierung wurde in Anwesenheit von Dexamethason (10^{-6} M) durchgeführt.
Inkubation: offene Symbole: Kontrolle (basale Glucosebilanz); geschlossene Symbole: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
(N = 3 (Kulturschalen))
Abszisse: µg Glucose/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)


900
700
500
300
100
0
1.
2.
3.
4.

sive Einfluß der Ins-Vorbehandlung im Falle der stimulierten Gluconeogenese weniger stark ausgeprägt; der deutlichste Effekt wird in beiden Fällen (Abb. 8 und 9) am 4. Tag beobachtet, mit 29 % (gefütterte Ratte) bzw. 26 % (gehungerte Ratte) der jeweiligen Kontrollen (Dex), während die Differenzen am 1. und 2. Tag weniger als 10 % bzw. ca. 15 % (gehungerte bzw. gefütterte Ratte) betragen und am 3. Tag in beiden Fällen nicht signifikant verschieden sind.

Bei der Gegenüberstellung des Verlaufs der stimulierten Gluconeogenese bei Hepatozyten gefütterter und gehungerter Ratten zeigt sich zwischen dem 2. und 4. Tag eine weitgehend parallele Abnahme der Gluconeogenesekapazität (± Ins), während die Abnahme zwischen dem 1. und 2. Tag bei Hepatozyten vom gehungerten Tier, von einem höheren Ausgangswert ausgehend, deutlich stärker ausgeprägt ist als bei Hepatozyten vom gefütterten Tier. Eine entsprechende Feststellung gilt auch für den Vergleich des Gesamtverlaufs der basalen Glucosebilanz.

Die Werte für die Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen liegen bei Hepatozyten vom gehungerten Tier während der gesamten Kultivierungszeit höher als bei den Hepatozyten von gefütterter Ratte, analog den Ergebnissen für die basale Glucosebilanz. Die stimulierte Gluconeogenese beträgt am 4. Tag, bezogen auf die jeweiligen Ausgangswerte am 1. Tag, bei Hepatozyten vom gefütterten Tier

---

Abb. 9: Einfluß der Vorbehandlung mit Insulin auf die Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: △,▲ : Kontrolle; ◇,◆ : Insulin (23 mU/ml). Die Kultivierung wurde in Anwesenheit von Dexamethason (10^{-6} M) durchgeführt.
Inkubation: offene Symbole: Kontrolle (basale Glucosebilanz); geschlossene Symbole: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. -4. Tag)

60 % (Kontrolle) bzw. 50 % (Ins), bei Hepatozyten vom gehungerten Tier 50 % (Kontrolle) bzw. 40 % (Ins).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Kapazität der Hepatozyten zur stimulierten Gluconeogenese durch mehrtägige Vorbehandlung mit Insulin (in Anwesenheit von Dex) nur vergleichsweise wenig erniedrigt wird (max. 30 %, am 4. Tag), während die Glucosebilanz unter basalen Inkubationsbedingungen gleichzeitig deutlich vermindert bzw. in Richtung Glucoseaufnahme verschoben ist. Kultivierte Hepatozyten von gefüttertem und gehungertem Tier werden im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur basalen und stimulierten Gluconeogenese durch Insulin in ähnlicher Weise beeinflußt; dies führt zu einem weitgehend analogen, jedoch quantitativ verschiedenen Verlauf der Glucosebilanz, wobei das frühe Auftreten (2. Tag) einer negativen Glucosebilanz unter basalen Inkubationsbedingungen nach Insulin-Vorbehandlung von Hepatozyten aus gefüttertem Tier besonders bemerkenswert erscheint.

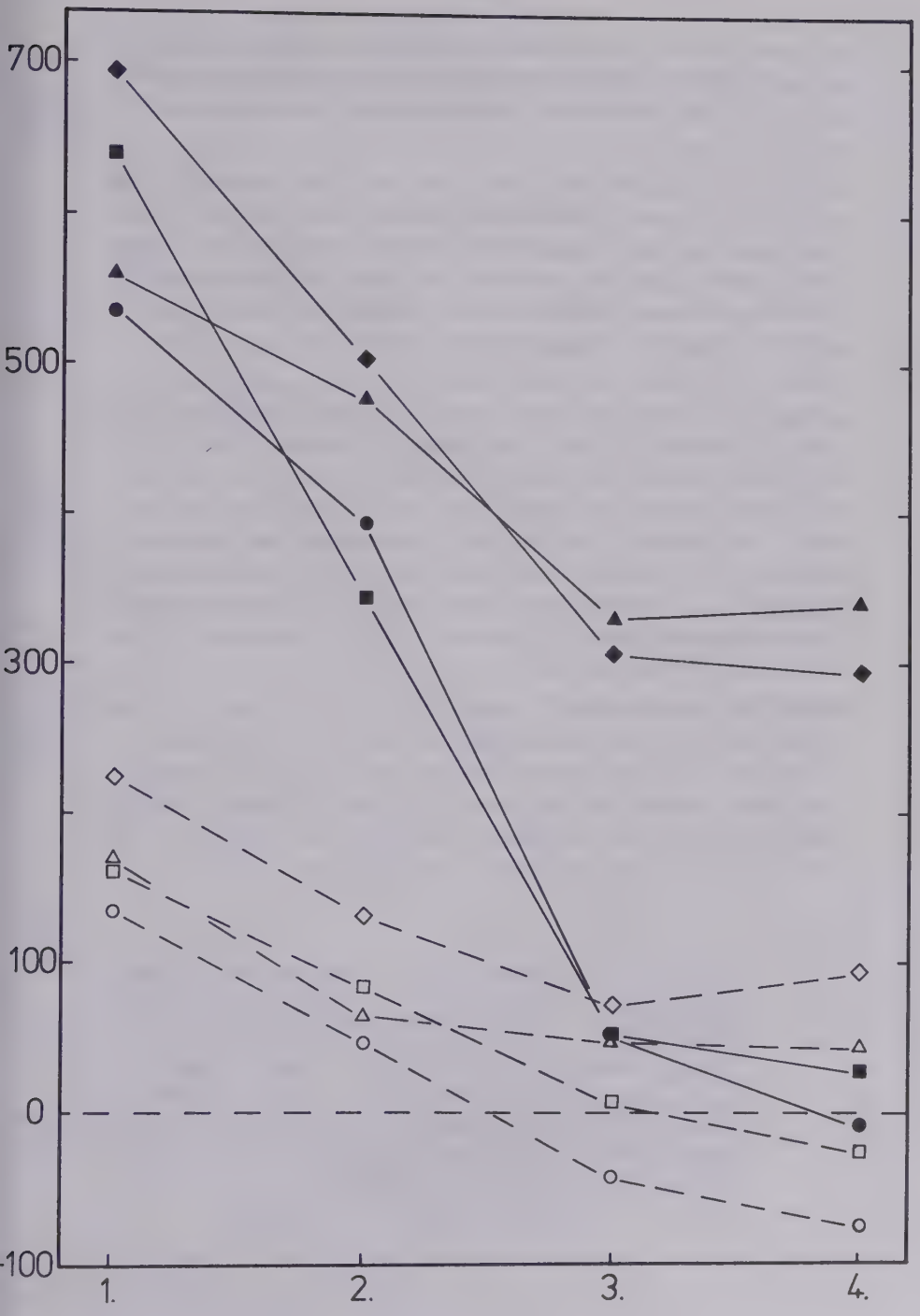
3.2.3.2. Einfluß der Vorbehandlung mit Dexamethason und Glucagon

Die Abb. 10 und 11 zeigen den Verlauf der Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden (Glucagon + Pyruvat/Lactat) Inkubationsbedingungen bei Hepatozyten aus gefütterter bzw. gehungerter Ratte nach Vorbehandlung mit Glucagon und Dexa-

---

Abb. 10: Einfluß der Vorbehandlung ± Gluca ± Dex auf die Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen während 4-tägiger Kultur (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Kultivierung: ○,● : Kontrolle; □,■ : Glucagon (10^{-6} M); △,▲ : Dexamethason (10^{-6} M); ◇,◆ : Dexamethason/Glucagon (je 10^{-6} M)
Inkubation: offene Symbole: Kontrolle (basale Glucosebilanz); geschlossene Symbole: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)


700
500
300
100
0
-100
1.
2.
3.
4.

methason (± Dex ± Gluca) während 4-tägiger Kultur. Dargestellt sind die Ergebnisse an jeweils einer Kultur, bei der die basale und stimulierte Glucosebilanz gleichzeitig ermittelt wurde.

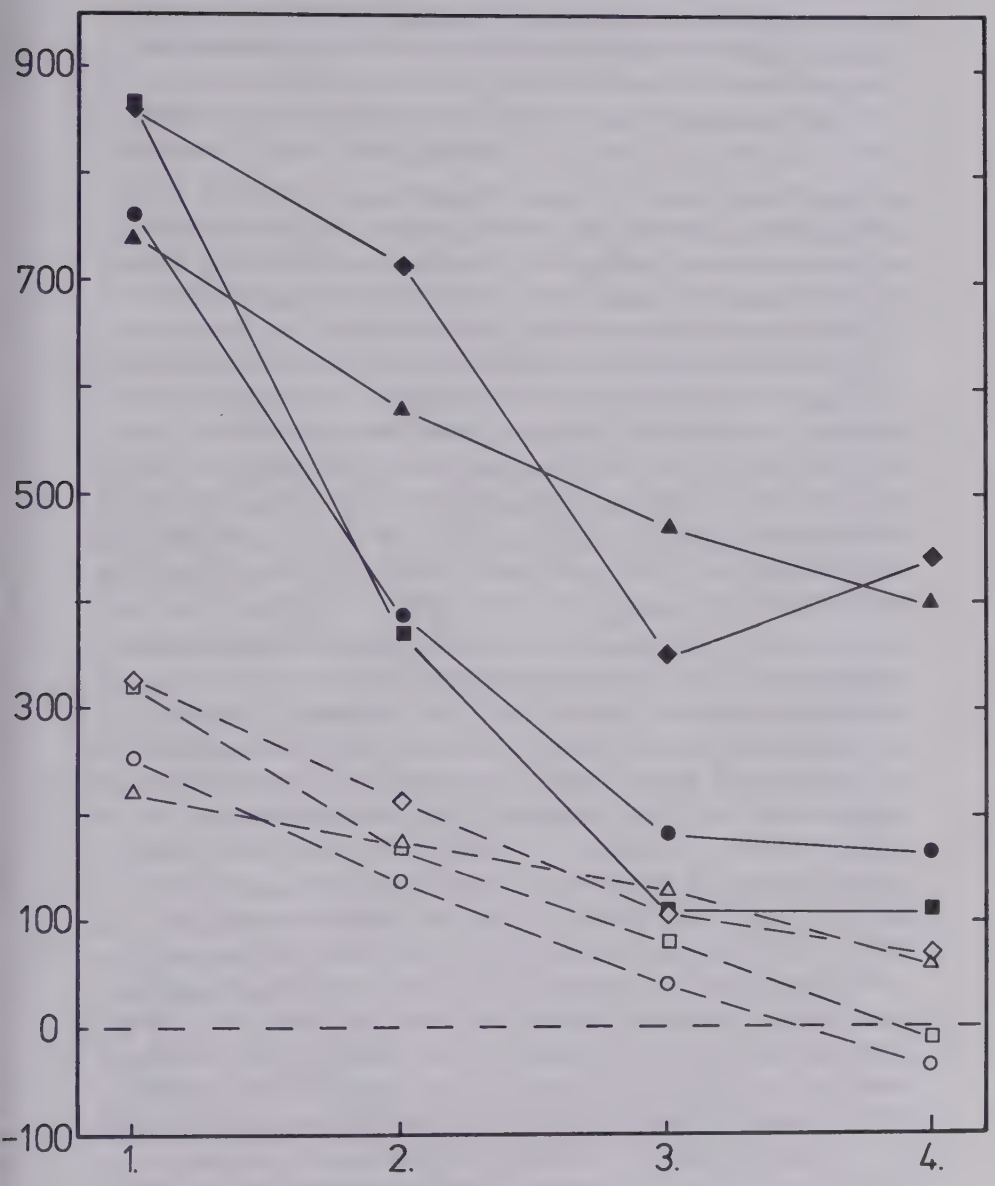
Wie aus den Abbildungen hervorgeht, zeigt die Glucosebilanz bei Hepatozyten vom gehungerten und gefütterten Tier in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung (Kultivierung) einen sehr unterschiedlichen Verlauf; in beiden Fällen sind die Unterschiede unter stimulierenden Inkubationsbedingungen besonders deutlich ausgeprägt.

Wurden die Hepatozyten unter Kontrollbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Hormonsupplemente, kultiviert, so nimmt die Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese (Gluca + Pyr/Lac) während der 4-tägigen Kultur stark ab, hier im Falle der Hungerrattenhepatozyten auf ca. 20 % des Wertes vom 1. Tag, während im Falle der Hepatozyten vom gefütterten Tier zu diesem Zeitpunkt unter denselben Inkubationsbedingungen eine negative Glucosebilanz, d.h. eine Netto-Glucoseaufnahme aus dem glucosearmen Inkubationsmedium (0,3 mM Anfangskonzentration) gefunden wurde.

Wurden die Hepatozyten in Anwesenheit von Glucagon (10^{-6} M) kultiviert, so ist die Abnahme der Fähigkeit zur Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen noch deutlicher ausgeprägt als nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen, und am 4. Tag werden Werte von teilweise weniger als 10 % des Anfangswertes gemessen (Abb. 11).

Abb. 11: Einfluß der Vorbehandlung ± Dexamethason ± Glucagon auf die Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: ○,● : Kontrolle; □,■ : Glucagon (10^{-6} M); △,▲ : Dexamethason (10^{-6} M); ◇,◆ : Dexamethason/Glucagon (je 10^{-6} M)
Inkubation: offene Symbole: Kontrolle (basale Glucosebilanz); geschlossene Symbole: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Abszisse: µg Glucose/mg Protein x 21,5 h
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)


900
700
500
300
100
0
-100
1.
2.
3.
4.

Im Gegensatz zu den beiden zuvor beschriebenen nicht-stabilisierenden Kulturbedingungen (K, Gluca) bleibt die Gluconeogenesekapazität der Zellen nach Dexamethason-Vorbehandlung in beiden Fällen auf einem vergleichsweise hohen Niveau erhalten: am 4. Tag beträgt die stimulierte Gluconeogenese hier noch 50 - 60 % der Ausgangswerte (Abb. 10 und 11).

Nach Kultivierung unter Dexamethason/Glucagon wird im allgemeinen ein typischer biphasischer Verlauf der stimulierten Gluconeogenese beobachtet: von einem Anfangswert, der allgemein über dem unter identischen Inkubationsbedingungen (Gluca + Pyr/Lac) ermittelten Wert nach Dex-Vorbehandlung liegt, nimmt die Gluconeogenesekapazität in der Anfangsphase schneller ab als nach Dex, so daß sie am 3. Tag im allgemeinen unterhalb des entsprechenden Dex-Wertes liegt. Danach kommt es in Hungerrattenhepatozyten regelmäßig zu einem mehr oder weniger stark aufgeprägten Wiederanstieg der Gluconeogenesekapazität, so daß diese am 4. Tag zumindest in demselben Bereich, meist jedoch deutlich höher als nach Dex-Vorbehandlung liegt (Abb. 11, siehe auch Tab. 7).

Die Werte für die Glucosebilanz unter basalen Inkubationsbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Hormon- und Substratsupplemente, liegen am 1. Tag in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung zwischen 25 und 32 % (Hepatozyten von gefütterter Ratte) bzw. 30 und 40 % (Hungerratten-Hepatozyten) der jeweiligen Werte unter stimulierenden Bedingungen (Gluca + Pyr/Lac). In beiden Fällen wird nach Gluca/Dex-Vorbehandlung die jeweils höchste Basalrate gefunden. Im Laufe der Kultur nimmt die basale Gluconeogenese nach Kontroll- und Gluca-Kultivierung, d.h. unter Bedingungen, unter denen auch die Kapazität zur stimulierten Gluconeogenese stark zurückgeht, annähernd linear ab, wobei die Werte nach Glucagon hier, im Gegensatz zur stimulierten Gluconeogenese, durchweg höher liegen als nach Kontrollbedingungen; unter diesen nicht-stabilisierenden Bedingungen wird ab dem 3. Tag (Hepatozyten von gefütterter Ratte) bzw. ab dem 4. Tag (Hungerratten-Hepatozyten) eine negative Glucosebilanz

gefunden. Nach Kultivierung in Anwesenheit von Dexamethason (Dex, Dex/Gluca) wird unter basalen Inkubationsbedingungen in beiden Fällen (Abb. 10 und 11) eine während der gesamten Kulturdauer positive Glucosebilanz beobachtet, wobei die Werte auf etwa ein Viertel der Ausgangswerte zurückgehen.

Nach der direkten Gegenüberstellung des Verlaufs der Glucosebilanz unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen am Beispiel jeweils einzelner Kulturen von Hepatozyten aus gefütterter (Abb. 10) und gehungerter Ratte (Abb. 11) zeigt die Tabelle 7 den Verlauf der stimulierten Gluconeogenese, der sich aus der Zusammenfassung der Ergebnisse an mehreren Kulturen von Hungerratten-Hepatozyten ergibt, die mit ± Dexamethason ± Glucagon vorbehandelt wurden.

Wie die Tabelle zeigt, werden zwischen den einzelnen Kulturen teilweise recht deutliche Unterschiede in den Absolutwerten der stimulierten Gluconeogenese gefunden, aus ihr ist gleichzeitig jedoch auch der sehr unterschiedliche Verlauf der Gluconeogenesekapazität in Abhängigkeit von der Hormonvorbehandlung zu erkennen, wie er zuvor anhand der Abb. 10 und 11 beschrieben wurde: die deutliche Abnahme unter Kontrollbedingungen, der im Vergleich zu diesen verstärkte Verlust bei Glucagon-Vorbehandlung, die gleichförmige Abnahme auf ca. 50 % des Ausgangswertes nach Dexamethason-Kultivierung und der biphasische Verlauf nach Dex/Gluca.

Aus der Zusammenstellung in Tabelle 7 geht hervor, daß sich die stimulierte Gluconeogenese nach Vorbehandlung unter Hormonbedingungen, die sich im weiteren Verlauf als nichtstabilisierend für die Gluconeogenesekapazität erweisen (K, Gluca), am 1. Tag nur insignifikant von den entsprechenden Werten nach Kultivierung unter stabilisierenden Bedingungen (Dex, Dex/Gluca) unterscheiden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen an einzelnen Kulturen, bei denen bereits am 1. Tag deutliche Differenzen zwischen unterschiedlich vorbehandelten Hepatozyten gemes-

Tabelle 7: Einfluß der Vorbehandlung ± Dexamethason ± Glucagon auf die stimulierte Gluconeogenese während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: ± Dexamethason ± Glucagon: je 10^{-6} M
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M, 1,5/15 mM)
( ): Anzahl verschiedener Kulturen
Große Buchstaben: $p < 0,05$; kleine Buchstaben: $p < 0,01$
(Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test angewandt)
Angaben in µg Glucose/mg Protein x 21,5 h

Hormone	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Kontrolle	660 ± 130 (5) A,a	363 ± 52 (5) B,b	179 ± 57 (5) B,b	116 ± 50 (5) C,b
Gluca	718 ± 144 (5) A,a	319 ± 65 (5) B,b	84 ± 27 (5) C,c	72 ± 58 (5) C,b
Dex	684 ± 80 (7) A,a	555 ± 64 (7) A,a	460 ± 57 (6) A,a	365 ± 91 (7) B,a
Dex/Gluca	754 ± 93 (6) A,a	531 ± 124 (5) A,a,b	392 ± 100 (5) A,a	500 ± 115 (5) A,a

sen wurden, siehe Abb. 10 und 11. In diesem Zusammenhang muß auf eine Fehlerquelle hingewiesen werden, die dazu führen kann, daß für Kontroll- und Glucagon-behandelte Zellen am 1. Tag eine im Vergleich zu Dexamethason und Dex/Gluca-behandelten Zellen überhöhte Gluconeogenese ermittelt wird: Unter Kontrollbedingungen und Glucagon kommt es in der Anfangsphase der Kultur zu einem ausgeprägten Zellverlust, da sich unter diesen Bedingungen eine größere Anzahl von vermutlich durch die Isolierungsprozedur beeinträchtigten Hepatozyten nicht an die in vitro-Bedingungen anzupassen vermögen und sich nach kurzer Zeit wieder vom Substratum ablösen. Das Ausmaß dieses Verlustes, der vor allem während des ersten Tages stattfindet, kann zwischen verschiedenen Kulturen (Zellpräparationen) variieren. Obwohl nicht abgesetzte oder schwach angeheftete nicht-vitale Zellen im Rahmen der Waschprozedur am Beginn der Inkubation weitgehend entfernt werden, nimmt der Proteingehalt während der Inkubationsperiode am 1. Tag (Beginn am Ende der Absetzphase, nach ca. 6 h) nach Kontroll- und Glucagon-Vorbehandlung im Gegensatz zur Vorbehandlung mit Dexamethason und Dexamethason/Glucagon weiter ab (ca. 20 - 30 %). Ein zumindest anfänglicher Beitrag dieser verlorengegangenen Zellen zur Gluconeogenese kann nicht ausgeschlossen werden und müßte gegebenenfalls zu überhöhten Werten für die Glucosebildung führen. Eine hierdurch bedingte Variabilität könnte der Grund für die aus Tab. 7 ersichtlichen, nach Kontroll- und Gluca-Vorbehandlung vergleichsweise größeren Differenzen zwischen einzelnen Kulturen als nach Dexamethason- und Dex/Gluca-Vorbehandlung sein. Aufgrund dieses nicht quantifizierbaren Einflusses von Zellverlusten ist der direkte Vergleich der ermittelten Gluconeogenesewerte von Kontroll- bzw. Glucagon-vorbehandelten mit Dexamethason- bzw. Dex/Gluca-kultivierten Zellen am 1. Tag nur bedingt möglich. Dieser Einfluß entfällt jedoch bei der Gegenüberstellung der Werte K:Gluca und Dex:Dex/Gluca, da hier jeweils ähnliche Proteinwerte gefunden werden; daher ergibt sich aus der Tab. 7 für die stimulierte Gluconeogenese am 1. Tag, übereinstim-

mend mit den Ergebnissen in Abb. 10 und 11: Gluca/Dex > Dex und Gluca > Kontrolle; aufgrund großer Differenzen zwischen einzelnen Kulturen sind die Werte in Tab. 7 für den 1. Tag jedoch nicht signifikant verschieden.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse in den Abb. 10 und 11 sowie Tab. 7 ist festzustellen, daß die Fähigkeit zur Gluconeogenese unter basalen und stimulierenden Inkubationsbedingungen bei Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier durch die längerfristige Kultivierung unter ± Dexamethason ± Glucagon in sehr unterschiedlichem Ausmaß beeinflußt wird.

Unter basalen Inkubationsbedingungen, d.h. in serumhaltigem Medium ohne Glucosesupplementierung (0,3 mM Glucose, aus dem Serumanteil), wird nur bei Vorbehandlung mit Dexamethason (Dex, Dex/Gluca) während der gesamten Kulturdauer eine positive Glucosebilanz gefunden, während die Zellen nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen oder Glucagon ab dem 3. Tag (Hepatozyten vom gefütterten Tier) bzw. 4. Tag (Hungerratten-Hepatozyten) zur Netto-Glucoseaufnahme übergehen; dabei ist die Bilanz, im Gegensatz zu den Ergebnissen für die stimulierte Gluconeogenese, für die Glucagon-behandelten Zellen während der gesamten Kulturdauer positiv gegenüber den unter Kontrollbedingungen kultivierten Hepatozyten, siehe Abb. 10 und 11.

In diesem Zusammenhang ist auf die Rolle der Medienglucose auf die Glucosebilanz unter basalen Inkubationsbedingungen hinzuweisen. Die Inkubationen erfolgten unter sehr niedrigen Anfangskonzentrationen an Glucose (ca. 0,3 mM). Diese Konzentration geht unter den Bedingungen der hohen Glucoseaufnahme, wie sie bei unter Kontrollbedingungen vorbehandelten Hepatozyten vom gefütterten Tier am 4. Tag beobachtet wird (Abb. 10), auf weniger als 0,1 mM zurück. Wie Inkubationen unter höheren Anfangskonzentrationen bestätigen (nicht gezeigt), ist die Glucoseaufnahme unter diesen Bedingungen durch die geringe vorhandene Glucosemenge limitiert: Bei 0,7 mM Glucose nahm die basale Glucosebilanz bei

analog unter Kontrollbedingungen kultivierten Hepatozyten von gefütterter Ratte von +100 am 1. Tag auf -300 µg Glucose/mg Protein am 4. Tag ab; im letzteren Fall ging die Glucosekonzentration im Inkubationsmedium auf ebenfalls weniger als 0,1 mM zurück (siehe oben). Der am 4. Tag ermittelte Wert scheint einem Sättigungswert nahezukommen, da parallel hierzu unter 5,5 mM Glucose inkubierte Zellen eine nur wenig höhere Glucoseaufnahme zeigten (340 µg/mg). Nach Dex-Vorbehandlung nahm die basale Glucosebilanz bei einer Anfangskonzentration von 0,7 mM im Inkubationsmedium von +120 am 1. Tag auf +20 µg/mg am 4. Tag ab, während unter 5,5 mM Glucose am 4. Tag eine gegenüber den Kontrollen verminderte negative Bilanz (-100 µg/mg) gefunden wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Zellen bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon die Fähigkeit zur Gluconeogenese unter basalen Inkubationsbedingungen zunehmend verlieren und eine mit der Kulturdauer ansteigende Tendenz zur Glucoseaufnahme auch unter sehr niedrigen extrazellulären Glucosekonzentrationen zeigen. Diese hohe Glucoseaufnahme ist vermutlich mit einer verstärkten Glykolyse verbunden, da die Zellen unter diesen Bedingungen kein Glykogen zu synthetisieren vermögen (Kap. 3.1.), und andererseits eine erhöhte Fettsynthese, die sich in der Bildung von mikroskopisch sichtbaren Fetttröpfchen äußert, nur in Anwesenheit von Ins beobachtet wird. Andererseits geht aus diesen Experimenten hervor, daß die Veränderung der Hepatozyten in Richtung eines glykolytischen Zustandes durch Kultivierung in Anwesenheit von Dexamethason (Dex, Dex/Gluca) verhindert wird.

Die Fähigkeit der Hepatozyten zur Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (Basalmedium + Gluca + Pyr/Lac) wird durch die längerfristige Kultivierung unter ± Dexamethason ± Glucagon in noch ausgeprägterem Maße unterschiedlich beeinflußt als die basale Gluconeogenese (Abb. 10, 11 und Tab. 7). Die Kapazität zur stimulierten Gluconeogenese geht bei Hepatozyten vom gehungerten und gefütterten Tier nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon drastisch zurück; sie beträgt am 4. Tag bei

Hepatozyten vom gehungerten Tier im allgemeinen ca. 20 bzw. 10 % der Werte vom 1. Tag, während bei Hepatozyten vom gefütterten Tier negative Bilanzen auftreten können (Abb. 10).

Im Gegensatz hierzu ist die Abnahme der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese nach Vorbehandlung mit Dexamethason (Dex, Dex/Gluca) deutlich verringert, so daß diese nach 4 Tagen auf dem vergleichsweise hohen Niveau von ca. 50 % der Ausgangswerte erhalten bleibt (Abb. 10, 11 und Tab. 7). Die Vorbehandlung mit Glucagon übt offensichtlich einen desensibilisierenden Einfluß auf die glucagonstimulierte Gluconeogenese aus: Bei Kultivierung mit diesem Hormon kommt es zu einem gegenüber Kontrollbedingungen beschleunigten Verlust der Gluconeogenesekapazität, und am 3. und 4. Tag werden bei Hepatozyten vom gehungerten Tier allgemein deutlich niedrigere Werte gefunden als nach Vorbehandlung unter Kontrollbedingungen (Abb. 11 und Tab. 7). Dieser desensibilisierende Einfluß des Glucagons ist vermutlich auch die Ursache für die im Vergleich zu Dex-behandelten Zellen stärker ausgeprägte initiale Abnahme der stimulierten Gluconeogenese unter Dex/Gluca. Der in den meisten Fällen beobachtete, ausgesprochen biphasische Verlauf unter Dex/Gluca, mit einem Minimum am 3. Tag, deutet darauf hin, daß der desensibilisierende Einfluß des Glucagons in Anwesenheit von Dex im Laufe der Kultivierung zurückgeht und schließlich ein von beiden Hormonen gemeinsam ausgeübter positiver Einfluß auf die stimulierte Gluconeogenese überwiegt, so daß die Zellen am 4. Tag nach Dex/Gluca allgemein eine höhere Kapazität zur stimulierten Gluconeogenese besitzen als nach Dex (Tab. 7).

3.2.4. Einfluß sequentieller Hormonvorbehandlung auf die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten von gehungerter Ratte

Um den unterschiedlichen Einfluß verschiedener Hormonbedingungen auf die Gluconeogenesekapazität der kultivierten Hepatozyten näher zu charakterisieren (s. Abb. 10, 11 und Tab. 7), wurden Umsetzexperimente vorgenommen. Hierbei sollte einerseits untersucht werden, wie sich eine unterschiedlich lange Vorbehandlung unter stabilisierenden Hormonbedingungen (Dex) auf den zeitlichen Verlauf der Kapazität nach dem Umsetzen auf nicht-stabilisierende Hormonbedingungen auswirkt, und andererseits, inwieweit die unter nicht-stabilisierenden Hormonbedingungen (K, Gluca) beobachtete starke Abnahme rückgängig gemacht werden kann. Da unter verschiedenen Hormonbedingungen eine deutlich unterschiedliche Abnahme der Zellzahl bzw. des Proteingehaltes pro Kulturschale beobachtet wurde, erscheint eine mögliche Verschiebung in der Zusammensetzung der Hepatozytenpopulation als Ursache für den Verlust der Gluconeogenesekapazität denkbar: Unter Bedingungen, die sich als nicht-stabilisierend erweisen (K, Gluca), wird gleichzeitig ein hoher Zellverlust gefunden: nach 4 Tagen beträgt der Proteingehalt nur noch ca. 50 % des jeweiligen Wertes zum Zeitpunkt des 1. Medienwechsels (6 h). Im Gegensatz dazu ist die Abnahme in Anwesenheit von Dexamethason oder Dex/Gluca deutlich geringer (maximal 20 %) und unter Ins/Dex oder Ins/Dex/Gluca wird in diesem Zeitraum keine signifikante Veränderung der Zellzahl (bzw. des Proteingehaltes) gefunden. Da die Hepatozyten unter den hier angewandten Bedingungen nicht proliferieren (126) und auch die Zahl von Nichtparenchymzellen unter den Bedingungen der Konfluenz der Monolayer vernachlässigbar klein ist, können die Kulturen unter den stabilisierenden Hormonbedingungen (Dex, Dex/Gluca, Ins/Dex/Gluca) vom 1. Medienwechsel an als in ihrer Zusammensetzung weitgehend konstant angesehen werden. Demgegenüber wäre unter nicht-stabilisierenden Bedingungen (Kontrolle, Gluca) eine

mit dem Zellverlust einhergehende selektive Anreicherung weniger Gluconeogenese-kompetenter Zellen nicht auszuschließen.

Die Inkubationen im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluß der sequentiellen Hormonbehandlung wurden für die verschieden vorbehandelten Zellen von gehungerter Ratte nach der in Kap. 2.6.4. beschriebenen Waschprozedur unter identischen, stimulierenden Bedingungen (Gluca + Pyr/Lac) durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Kulturen sind die Ergebnisse relativ zu den jeweiligen Werten nach Kultivierung mit Dexamethason angegeben.

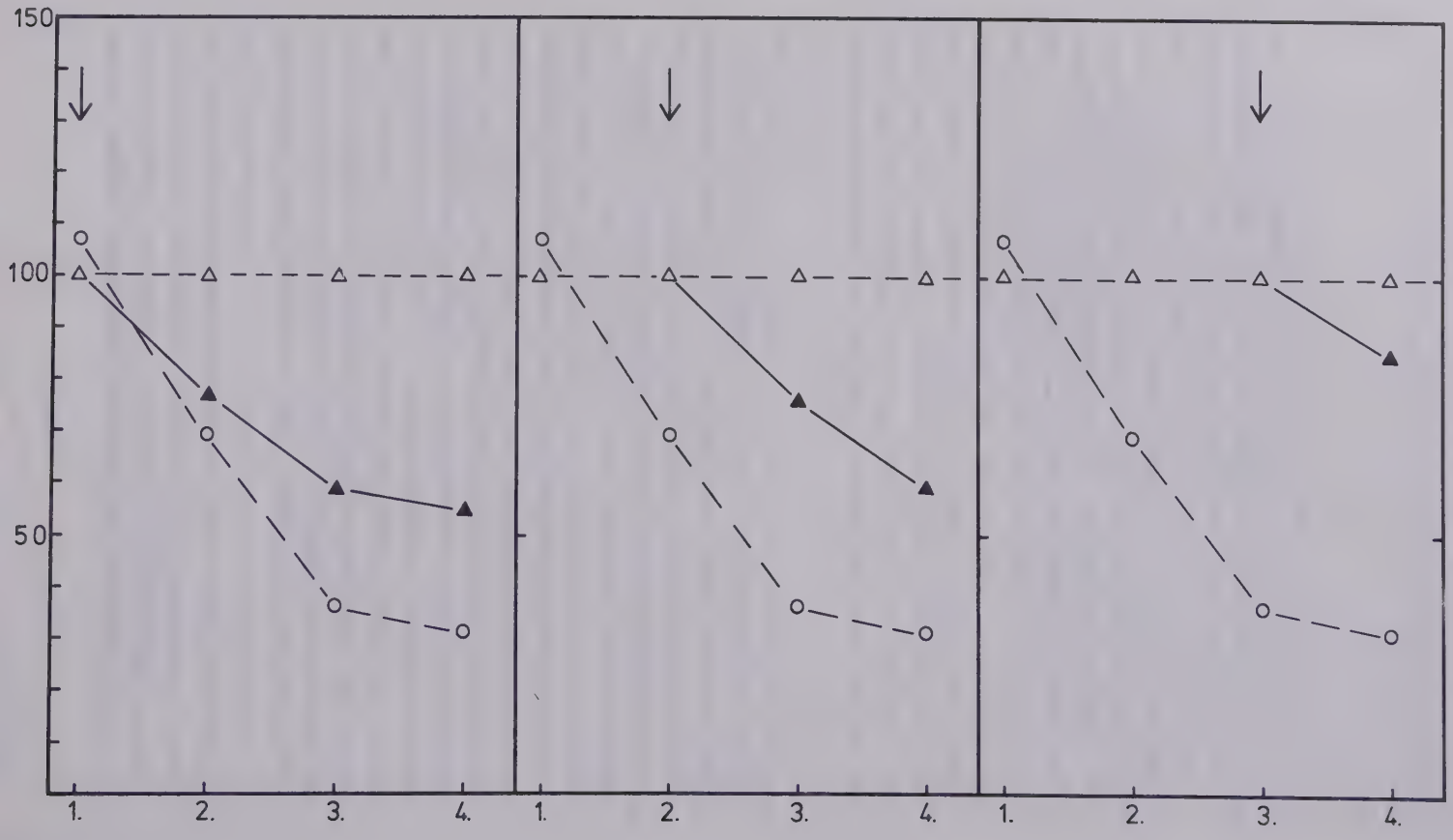
3.2.4.1. Umsetzen von Dexamethason auf Kontrollbedingungen

Der Einfluß einer unterschiedlich langen Kultivierung unter stabilisierenden Hormonbedingungen auf den Verlauf der Gluconeogenesekapazität nach dem Umsetzen auf nicht-stabilisierende Bedingungen ist in Abb. 12 für den Fall des Wechsels von Dexamethason auf Kontrollbedingungen dargestellt. Die Abbildung zeigt den Verlauf der stimulierten Gluconeogenese bei Hepatozyten, die am 1. bis 3. Kulturtag, d.h. nach 6-, 28- oder 48-stündiger Kultivierung unter Dexamethason auf Kontrollbedingungen, d.h. serumhaltiges Medium ohne Hormonsupplemente, umgesetzt und 1-3 Tage später inkubiert wurden. Zum Vergleich ist der bei durchgehend unter

---

Abb. 12: Einfluß der sequentiellen Hormonvorbehandlung auf die stimulierte Gluconeogenese: Umsetzen von Dexamethason auf Kontrollbedingungen (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: ○: Kontrolle; △: Dexamethason (10^{-6} M)
▲: Dexamethason → Kontrolle
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Umsetzens an.
Abszisse: relative Gluconeogenese (Dex = 100 %)
Ordinate: Kulturdauer (1. - 4. Tag)


150
100
50
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.

Kontrollbedingungen kultivierten Zellen gefundene Verlauf eingezeichnet. Die Angaben erfolgen in Prozent der Werte, die bei nicht umgesetzten, durchgehend in Anwesenheit von Dex kultivierten Hepatozyten zu den jeweiligen Zeitpunkten ermittelt wurden.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, nimmt die Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese nach dem Umsetzen zu verschiedenen Zeitpunkten deutlich und mit der Zeit nach dem Wechsel zunehmend ab. Diese Abnahme ist jedoch geringer als bei den durchgehend unter Kontrollbedingungen kultivierten Zellen, so daß auch 3 Tage nach dem Umsetzen noch deutlich höhere Werte als unter diesen Vorbedingungen gefunden werden. Eine auf die Absetzphase (6 h) begrenzte Anwesenheit von Dex genügt also bereits zur längerfristigen Beibehaltung einer gegenüber unbehandelten Zellen erhöhten Gluconeogenesekapazität, während andererseits auch eine längere Vorbehandlung mit diesem Hormon nicht zur völligen Stabilisierung der Kapazität über den Zeitpunkt des Umsetzens hinaus führt. Die Anwesenheit von Dex bis zum Beginn der Inkubation scheint also Voraussetzung für die optimale Hormonantwort zu sein.

Da bei der Kultivierung unter Dexamethason eine deutlich geringere Abnahme der Zellzahl gefunden wird als in Medium ohne Hormonsupplementation, und dieser Verlust auch dann gering bleibt, wenn das Umsetzen auf Kontrollbedingungen bereits nach 6 h vorgenommen wurde, könnte die unterschiedliche Gluconeogenesekapazität der Hepatozyten, die nach ± Dex-Behandlung während der Absetzphase noch am 4. Tag feststellbar ist, auf eine veränderte Zusammensetzung der Hepatozytenpopulation zurückzuführen sein. Andererseits könnten durch die initiale Anwesenheit von Dex intrazelluläre und/oder interzelluläre Prozesse nachhaltig beeinflußt werden, die bereits während der Adaptationsphase an die in vitro-Bedingungen einen Verlust der Fähigkeit zur adäquaten Hormonantwort, hier der glucagonstimulierten Gluconeogenese aus Pyruvat/Lactat, initiieren.

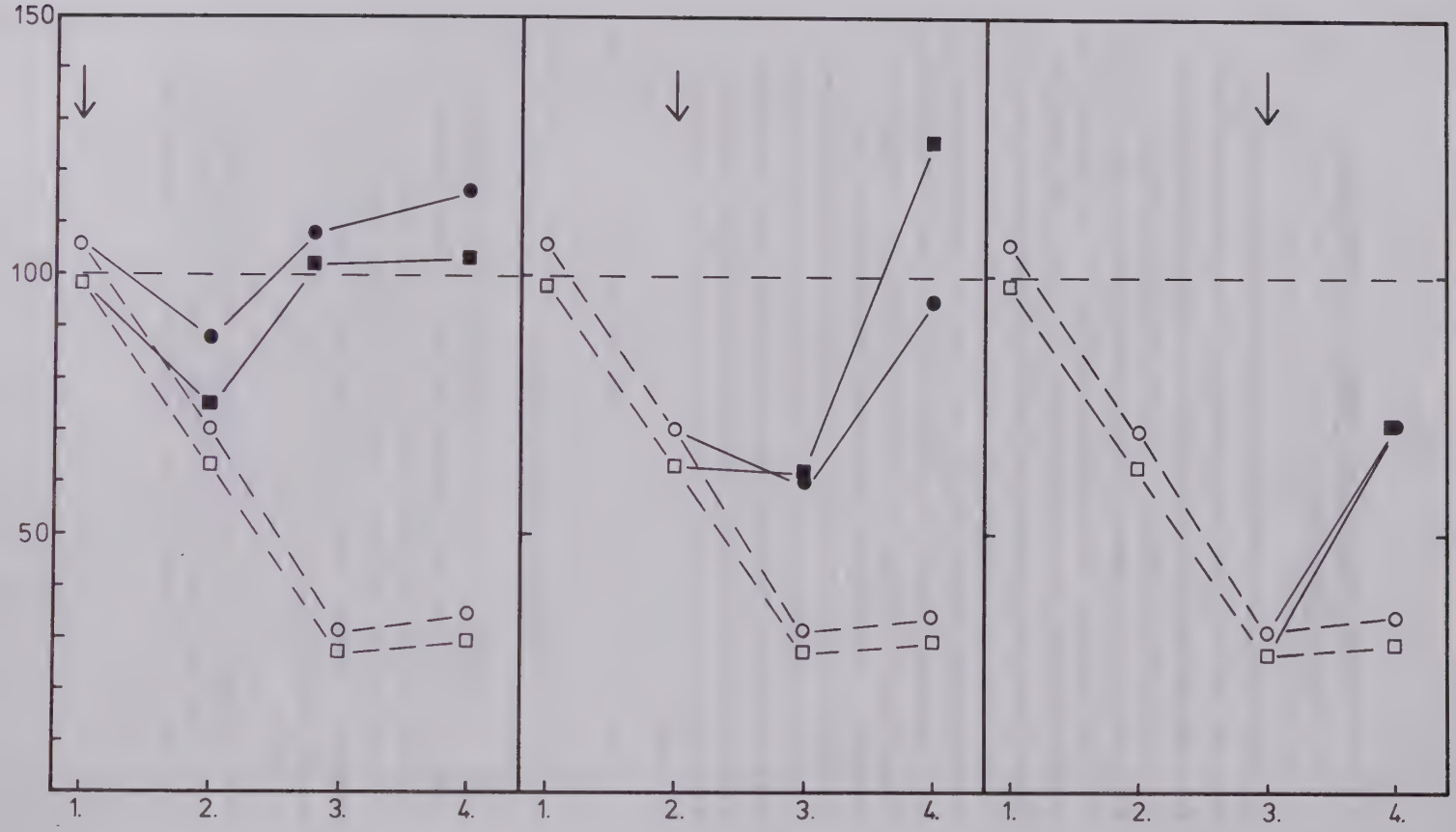
3.2.4.2. Umsetzen auf Gluconeogenese-stabilisierende Hormonbedingungen

Die deutlich unterschiedliche Aufrechterhaltung der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese, die nach Dexamethason- und Dex/Gluca-Vorbehandlung im Vergleich zur Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon beobachtet wird, wurde zuvor bereits näher beschrieben, s. Abb. 10, 11 und Tab. 7. Um zu untersuchen, inwieweit die unter nicht-stabilisierenden Hormonbedingungen (K, Gluca) gefundene Abnahme einem irreversiblen Verlust der Gluconeogenese-Kapazität der Zellen gleichkommt, wurden die Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten (1. - 3. Tag) auf Hormonbedingungen umgesetzt, welche die Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese auf vergleichsweise hohem Niveau zu stabilisieren vermögen, wenn sie vom Absetzen an anwesend sind: Dex, Dex/Gluca und Ins/Dex/Gluca. Zum Vergleich wurden auch Dexamethason-vorbehandelte Zellen auf die beiden übrigen stabilisierenden Bedingungen umgesetzt, unter denen im Gegensatz zu Dexamethason ein typischer biphasischer Verlauf der Gluconeogenesekapazität während mehrtägiger Kultivierung gefunden wird.

3.2.4.2.1. Umsetzen auf Dexamethason

Abb. 13 zeigt den Verlauf der stimulierten Gluconeogenese (Dex = 100 %) nach dem Wechsel von Kontrollbedingungen und Glucagon auf Dexamethason. Die Zellen wurden nach 6, 28 oder 48 Stunden umgesetzt und die Gluconeogenesekapazität während 1-3 Tagen danach durch Inkubation unter stimulierenden Bedingungen ermittelt (Glucagon + Pyruvat/Lactat, 21,5 h).

Wie die Abbildung zeigt, kann die drastische Abnahme der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese, die unter Kontrollbedingungen und besonders nach Glucagonvorbehandlung


150
100
50
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.

gefunden wird, siehe Abb. 11 und den Verlauf bei nicht-umgesetzten Zellen in Abb. 13 (unterbrochene Linien), durch Dexamethason-Behandlung rückgängig gemacht werden. Nach eintägiger Dex-Kultivierung wird im Falle des Wechsels am 1. oder 2. Kulturtag eine deutliche Verminderung des Rückgangs, beim Wechsel am 3. Tag ein deutlicher Anstieg gegenüber den nicht-umgesetzten Kontrollen gefunden. In der Folge kommt es zu einer relativen Zunahme der stimulierten Gluconeogenese, so daß 2 Tage nach dem Umsetzen die nach durchgehender Kultivierung unter Dexamethason beobachteten Werte erreicht und teilweise deutlich übertroffen werden. Eine Umsetzung am 2. Tag (28 h) nach Kultivierung unter Glucagon erweist sich dabei als besonders günstig im Hinblick auf die Wiedergewinnung der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese. Am 4. Tag (Inkubation: 72 - 93,5 h) zeigen die Hepatozyten nach dieser sequentiellen Behandlung allgemein eine deutlich höhere Gluconeogenesekapazität als nach durchgehender Dex-Behandlung (s. Diskussion, Kap. 4.2.3.).

Abb. 13: Einfluß der sequentiellen Hormonvorbehandlung auf die stimulierte Gluconeogenese: Umsetzen von Kontrollbedingungen bzw. Glucagon auf Dexamethason (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: ○: Kontrolle; □:Glucagon (10^{-6} M) ●: Kontrolle → Dexamethason (10^{-6} M); ■: Glucagon → Dexamethason (10^{-6} M)
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Umsetzens an.
Abszisse: Relative Gluconeogenese (Dex = 100 %)
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)

3.2.4.2.2. Umsetzen auf Dexamethason/Glucagon

Die Kultivierung unter Dex/Gluca führt zu einem mehr oder weniger deutlich ausgeprägten biphasischen Verlauf der Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (s. Abb. 11 und Tab. 7): Am 3. Tag wird im allgemeinen ein Minimum beobachtet, wobei die Werte unter den Dex-Vergleichswerten liegen, während sie am 1. und 4. Tag allgemein höher liegen als bei durchgehend unter Dexamethason-kultivierten Zellen.

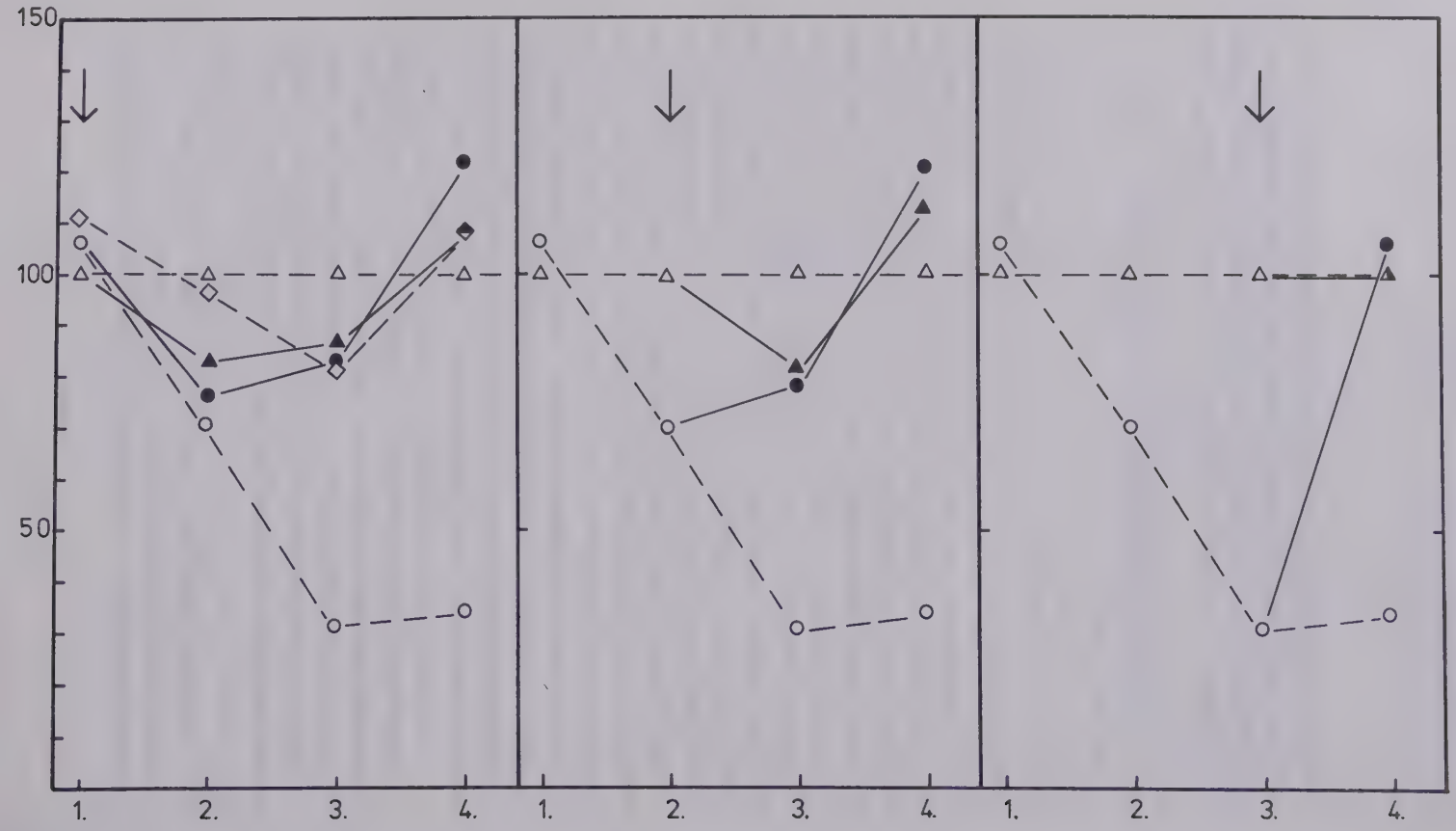
Der Verlauf der Gluconeogenese nach dem Wechsel auf Dex/Gluca ist in Abb. 14 für den Fall der Kontroll- und Dexamethason-Vorbehandlung dargestellt; Umsetzungen und Inkubationen erfolgten in der zuvor für sequentielle Hormonbehandlungen beschriebenen Weise. In der Abbildung ist zusätzlich zum Verlauf unter unveränderten Ausgangsbedingungen (K, Dex) auch der Verlauf bei durchgehender Kultivierung unter Dex/Gluca eingezeichnet; alle Angaben erfolgen wiederum relativ zu den jeweiligen Werten nach Dex-Kultivierung.

Wie die Abbildung zeigt, kommt es nach dem Wechsel von Kontrollbedingungen auf Dex/Gluca, unabhängig vom Zeitpunkt des Umsetzesn, zu einer schnellen Wiedergewinnung einer hohen Gluconeogenesekapazität der kultivierten Hepatozyten: Nach einem Tag (beim Wechsel am 2. oder 3. Tag) bzw. nach 2 Tagen (beim Wechsel am 1. Tag) werden die entsprechenden

---

Abb. 14: Einfluß der sequentiellen Hormonvorbehandlung auf die stimulierte Gluconeogenese: Umsetzen von Kontrollbedingungen bzw. Dexamethason auf Dexamethason/Glucagon (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: ○: Kontrolle; △: Dexamethason (10^{-6} M); ◇: Dexamethason/Glucagon (je 10^{-6} M) ●: Kontrolle → Dex/Gluca (10^{-6} M) ▲: Dex → Dex/Gluca (10^{-6} M)
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Umsetzens an.
Abszisse: Relative Gluconeogenese (Dex = 100 %)
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)


150
100
50
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.
1.
2.
3.
4.

Dex/Gluca-Vergleichswerte erreicht, und nach frühem Umsetzen (1., 2. Tag) werden am 4. Tag die entsprechenden Werte nach durchgehender Kultivierung unter Dex und Gluca/Dex übertroffen.

Beim Umsetzen von Dexamethason auf Dex/Gluca wird beim Wechsel am 1. oder 2. Tag eine vorübergehende Abnahme der Gluconeogenesekapazität beobachtet, analog dem allgemeinen Verlauf nach Kultivierung unter Dex/Gluca, und ein diesen Vergleichsbedingungen entsprechender relativer Anstieg am 3. und 4. Kulturtag. Erfolgte der Wechsel am 3. Tag, so bleibt die stimulierte Gluconeogenese am 4. Tag unverändert; es kommt in dieser Phase also nicht mehr zu einer Abnahme, wie dies bei früherem Umsetzen im Rahmen des biphasischen Verlaufs beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, ähnlich wie dies bereits im Zusammenhang mit dem Umsetzen auf Dexamethason beschrieben wurde, daß die Abnahme der Fähigkeit zur Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen, wie sie unter nicht-stabilisierenden Hormonbedingungen, hier Kontrollbedingungen, beobachtet wird, keinen irreversiblen Verlust bedeutet, sondern daß es unter stabilisierenden Bedingungen, wie Gluca/Dex, unabhängig vom Zeitpunkt des Umsetzens zu einer schnellen Wiedergewinnung einer hohen Gluconeogenesekapazität kommt; andererseits bleibt auch beim frühen Umsetzen von Dexamethason auf Gluca/Dex der biphasische Verlauf erhalten, der bei durchgehender Kultivierung unter Gluca/Dex beobachtet wird und auf einen in der Anfangsphase der Kultur überwiegend negativen Effekt von Glucagon hinweist.

3.2.4.2.3. Umsetzen auf Insulin/Dexamethason/Glucagon

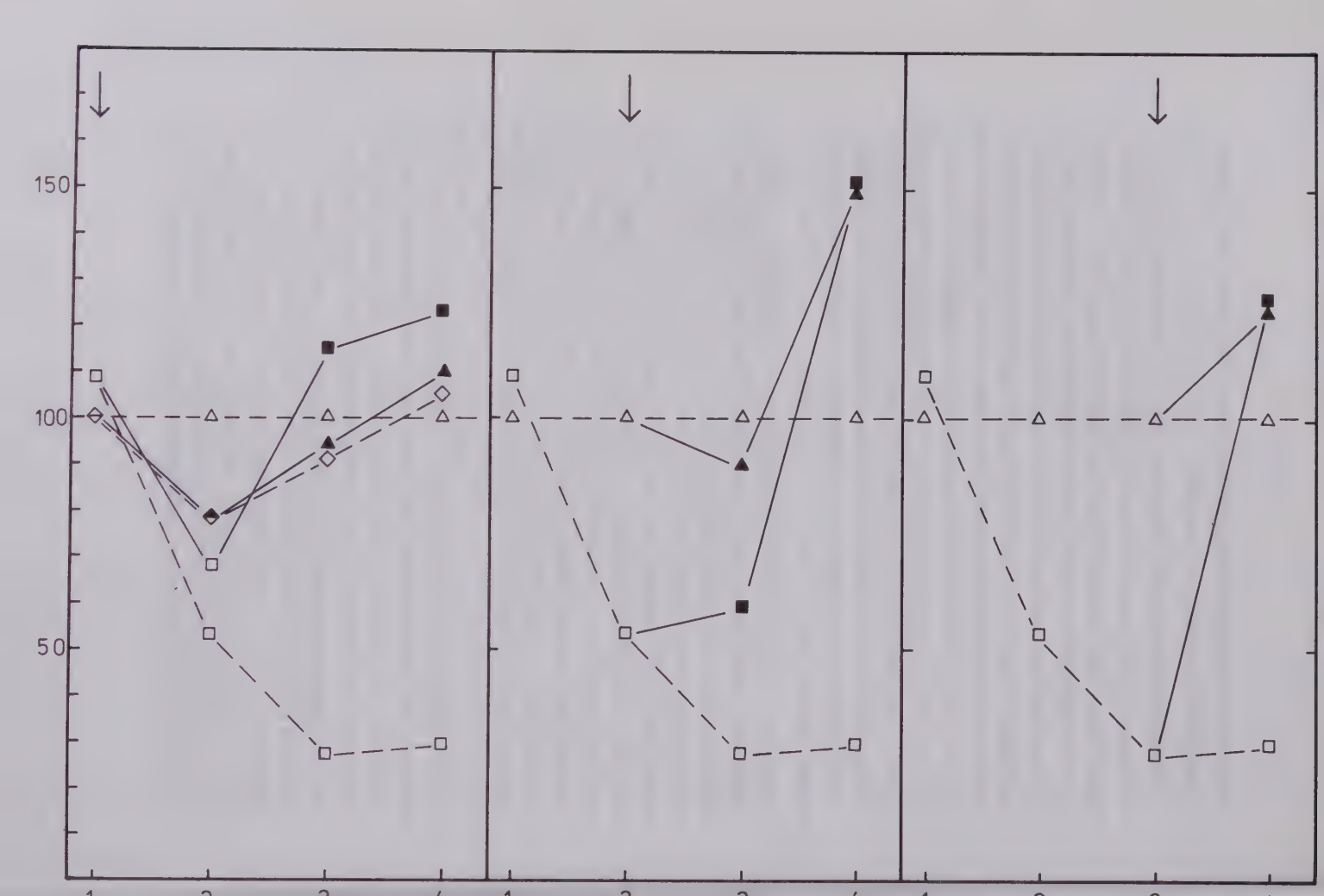
Unter Ins/Dex/Gluca kultivierte Hepatozyten von gehungerter Ratte zeigen, ähnlich wie im Falle der Dex/Gluca-Vorbehandlung, während mehrtägiger Kultur einen biphasischen Verlauf der stimulierten Gluconeogenese mit im Vergleich zu Dex-be-

handelten Zellen niedrigeren Werten am 2. und 3. Kulturtag (s. Kontrollverlauf in Abb. 15).

Diese Hormonkombination erweist sich als besonders wirksam, die unter Glucagon-Kultivierung induzierte Abnahme der Fähigkeit der Zellen zur stimulierten Gluconeogenese rückgängig zu machen: Unabhängig vom Zeitpunkt des Umsetzens zeigen die Zellen bereits 1 - 2 Tage nach dem Wechsel auf Ins/Dex/Gluca eine höhere Gluconeogenesekapazität als bei durchgehender Kultivierung unter Dexamethason oder Ins/Dex/Gluca (s. Abb. 15). Ähnlich wie im Falle des Wechsels auf Gluca/Dex (s. Abb. 14) ist die Zunahme von den niedrigen Ausgangswerten beim Umsetzen am 2. und 3. Tag besonders ausgeprägt, und am 4. Tag liegt die Gluconeogenesekapazität der gewechselten Zellen allgemein höher als die der nicht-umgesetzten Hepatozyten.

Werden die Zellen von Dexamethason auf Ins/Dex/Gluca umgesetzt, so zeigt sich nach dem Wechsel ein qualitativ ähnlicher Verlauf der stimulierten Gluconeogenese wie nach dem Umsetzen auf Gluca/Dex: beim Wechsel am 1. oder 2. Tag bleibt der biphasische Verlauf, d.h. eine initiale Abnahme relativ zu den Werten unter Dexamethason erhalten, während beim Umsetzen am 3. Tag ein direkter (relativer) Anstieg erfolgt. Die Werte liegen am 4. Tag, insbesondere nach dem Umsetzen am 2. Tag, deutlich höher als bei den durchgehend unter Dexamethason oder Ins/Dex/Gluca kultivierten Hepatozyten.

Diese Ergebnisse bestätigen die im Zusammenhang mit dem Wechsel auf Dexamethason und Dex/Gluca beschriebenen Beobachtungen (s. Abb. 13, 14): Beim Umsetzen auf stabilisierende Hormonbedingungen, hier Ins/Gluca/Dex, kann der Verlust der Gluconeogenesekapazität, den die Zellen unter nicht-stabilisierenden Hormonbedingungen, hier Gluca, zeigen, innerhalb von 1 - 2 Tagen rückgängig gemacht werden, wobei besonders unter Gluca/Dex und Ins/Dex/Gluca eine höhere Kapazität erreicht wird als bei durchgehender Kultivierung unter den stabilisierenden Bedingungen (s. Diskussion).


150
100
50

Andererseits bleibt der biphasische Verlauf, der aufgrund einer ausgeprägten initialen Abnahme der Gluconeogenese relativ zu Dex zustande kommt, auch nach dem frühen Umsetzen (1. und 2. Tag) Dex-vorbehandelter Zellen erhalten, was den in der Anfangsphase gegenüber Dexamethason überwiegenden negativen Effekt von Glucagon in den Hormonkombinationen Dex/Gluca und Ins/Dex/Gluca bestätigt.

Abb. 15: Einfluß der sequentiellen Hormonvorbehandlung auf die stimulierte Gluconeogenese: Umsetzen von Glucagon bzw. Dexamethason auf Insulin/Dexamethason/Glucagon (Hepatozyten von gehungerter Ratte)

Kultivierung: □: Glucagon (10^{-6} M); △: Dexamethason (10^{-6} M); ◇: Insulin/Dexamethason/Glucagon (23 mU/ml; 10^{-6} M; 10^{-6} M); ■: Glucagon → Insulin/Dexamethason/Glucagon; ▲: Dexamethason → Insulin/Dexamethason/Glucagon
Inkubation: Glucagon + Pyruvat/Lactat (10^{-6} M; 1,5/15 mM)
Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Umsetzens an.
Abszisse: Relative Gluconeogenese (Dex = 100 %)
Ordinate: Kultivierungszeit (1. - 4. Tag)

3.3. Glucose-6-Phosphatase

Die biochemischen und zytochemischen Untersuchungen der G6Pase wurden an kultivierten Zellen von gefütterter Ratte durchgeführt.

3.3.1. Biochemische Messungen

3.3.1.1. Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in W/AB-77-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten

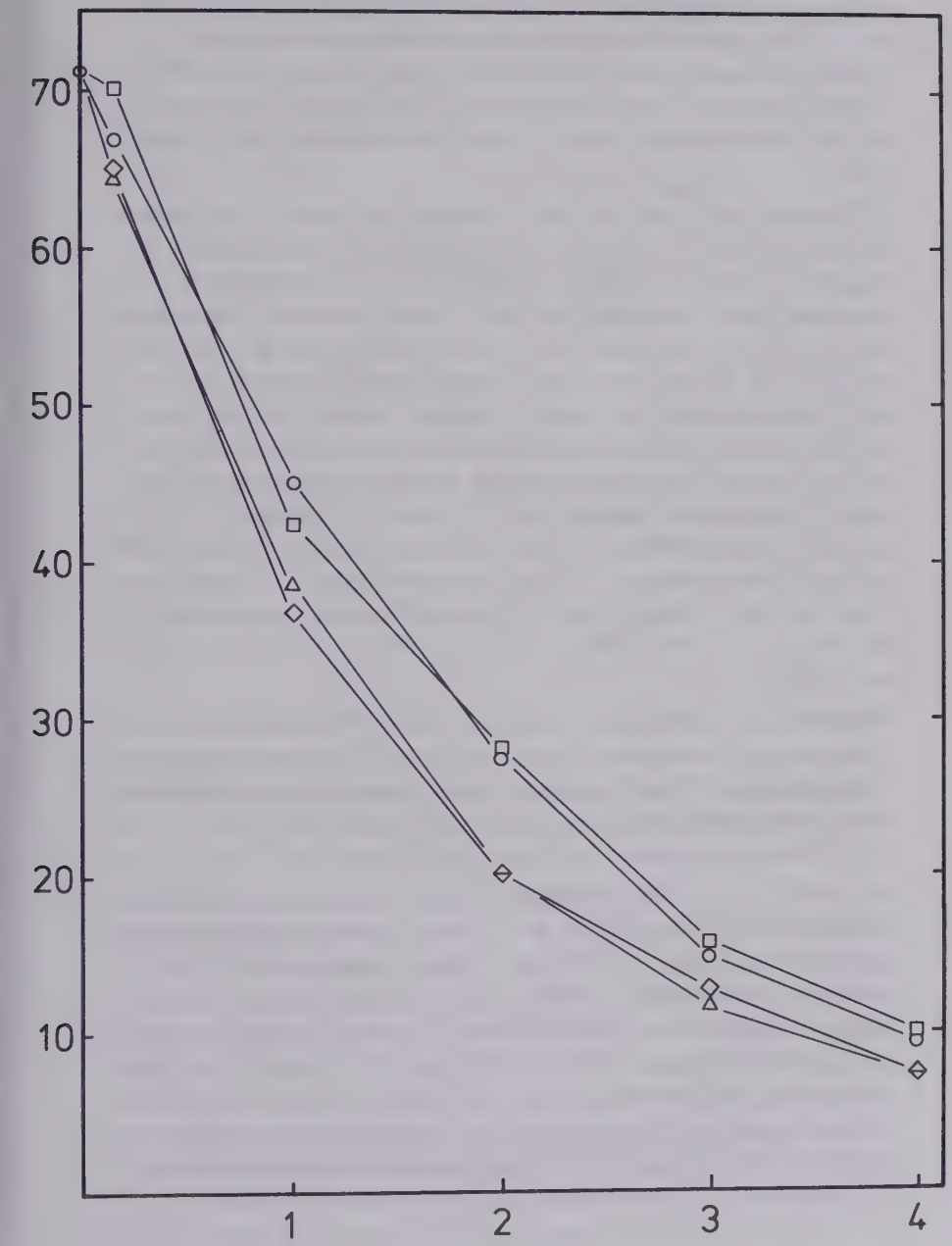
Der Einfluß verschiedener in vivo wirksamer Hormone auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten aus gefütterter Ratte wurde während mehrtägiger Primärkultur in Standardmedium, d.h. serumhaltigem W/AB-77-Medium (siehe Kap. 2.4.4.) untersucht; hierzu wurden die Zellen vom Absetzen an unter verschiedenen Hormonbedingungen kultiviert.

Die Abb. 16 zeigt den Verlauf der Aktivität während 4-tägiger Kultivierung unter ± Glucagon ± Dexamethason, d.h. unter Hormonbedingungen, deren unterschiedlicher Einfluß auf die Gluconeogenese-Kapazität der kultivierten Hepatozyten an anderer Stelle beschrieben wurde (siehe Kap. 3.2.3.2.). Wie aus der Abbildung hervorgeht, zeigt die G6Pase-Aktivität unter allen Bedingungen während der gesamten Kultivierungsdauer eine starke und in ihrem Verlauf sehr ähnliche

---

Abb. 16: Einfluß der Kultivierung ± Glucagon ± Dexamethason in W/AB-77-Medium auf die G6Pase-Aktivität während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Hormone: ○: Kontrolle; □: Glucagon (10^{-6} M) △: Dexamethason (10^{-6} M); ◇: Dexamethason/Glucagon (je 10^{-6} M)
Abszisse: Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)
Ordinate: Kultivierungszeit (Tage)


70
60
50
40
30
20
10
1
2
3
4

Abnahme; nach 4 Tagen ist eine Restaktivität von nur noch ca. 10 - 15 % des Ausgangswertes in den frisch isolierten Zellen vorhanden. Der Aktivitätsverlust ist in Anwesenheit von Dexamethason (Dex, Dex/Gluca) noch stärker ausgeprägt als bei Kultivierung unter Kontrollbedingungen oder Glucagon.

An dieser Stelle sei auf den korrigierten Anteil der unspezifischen Phosphatase(n) (siehe Kap. 2.7.3.) an der gesamten G6P-spaltenden Aktivität im Homogenat hingewiesen: da sich der absolute Betrag dieser zu korrigierenden Aktivität (ca. 7 - 11 mU/mg Protein) im Gegensatz zur Gesamt-G6Pase während der Kultur nur relativ wenig ändert, nimmt ihr Anteil im Verhältnis zur "spezifischen" G6Pase mit der Zeit zu. In Anwesenheit von Dexamethason wurde durchgehend ein höherer Anteil an unspezifischer Phosphatase gefunden als unter Kontrollbedingungen; nach 4 Tagen lag dieser im Bereich der spezifischen G6Pase. Die geringere Aktivität der G6Pase in Anwesenheit von Dexamethason (Abb. 16) resultiert also aus einem höheren Anteil unspezifischer Phosphatase bei ähnlicher Gesamt-G6Pase der unterschiedlich kultivierten Zellen.

Versuche, die G6Pase-Aktivität in W/AB-77-Medium durch Kultivierung in Anwesenheit anderer Hormone zu stabilisieren, ergaben die in Tab. 8 dargestellten Ergebnisse; die Werte sind in Prozenten der jeweiligen Aktivität unter Kontrollbedingungen angegeben.

Keine der untersuchten Hormonbedingungen vermag den starken Aktivitätsverlust, der in Abb. 16 in absoluten Werten dargestellt ist, deutlich zu vermindern. Bemerkenswert ist hierbei, daß Hormone, welche die G6Pase in vivo zu stimulieren vermögen, wie Dexamethason, T3 und Glucagon, hier keinen signifikanten stabilisierenden (T3, Gluca) oder gar einen eher negativen Effekt (Dex, Dex/T3, Dex/Ins) ausüben, während Insulin, welches die G6Pase-Aktivität in vivo zu unterdrücken vermag, hier einen stabilisierenden Einfluß im Vergleich zu den Kontrollen zeigt (Ins, Ins/Gluca).

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in W/AB-77-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Insulin: 23 mU/ml; Dexamethason, Glucagon, T3: 10^{-6} M

	Kultivierungszeit (Tage)			
	1	2	3	4
Hormone	Relative Aktivität (Kontrolle = 100 %)			
Kontrolle	100	100	100	100
T3	104	109	96	100
Ins	107	109	116	128
Ins/T3	100	110	108	102
Gluca/T3	108	120	108	n.b.
Dex/T3	95	98	100	79
Ins/Gluca	106	114	131	149
Ins/Dex	90	86	86	97

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Hormoneinflüsse auf die G6Pase-Aktivität sind nicht nur wegen der geringen bzw. in vivo-Ergebnissen widersprechenden Effekte unerwartet, sondern auch wegen des insgesamt ungewöhnlich hohen Aktivitätsverlustes. Frühere eigene Messungen (126) der G6Pase in Hepatozyten-Primärkulturen hatten eine deutlich geringere Abnahme (ca. 60 % innerhalb von 4 Tagen) ergeben; diese Zellen waren allerdings unter anderen Medien- und Inkubationsbedingungen kultiviert worden (L-15-Medium, fötales Kälberserum, Luftatmosphäre an Stelle von Luft/CO_2).

Um einen möglichen Einfluß des verwendeten Basalmediums auf die G6Pase-Aktivität und deren hormonelle Beeinflußbarkeit in der Kultur zu untersuchen, wurden, in Analogie zu den zuvor für W/AB-77-Medium beschriebenen Experimenten, entsprechende Untersuchungen in L-15-Medium durchgeführt.

3.3.1.2. Einfluß verschiedener Hormonbedingungen in L-15-Medium

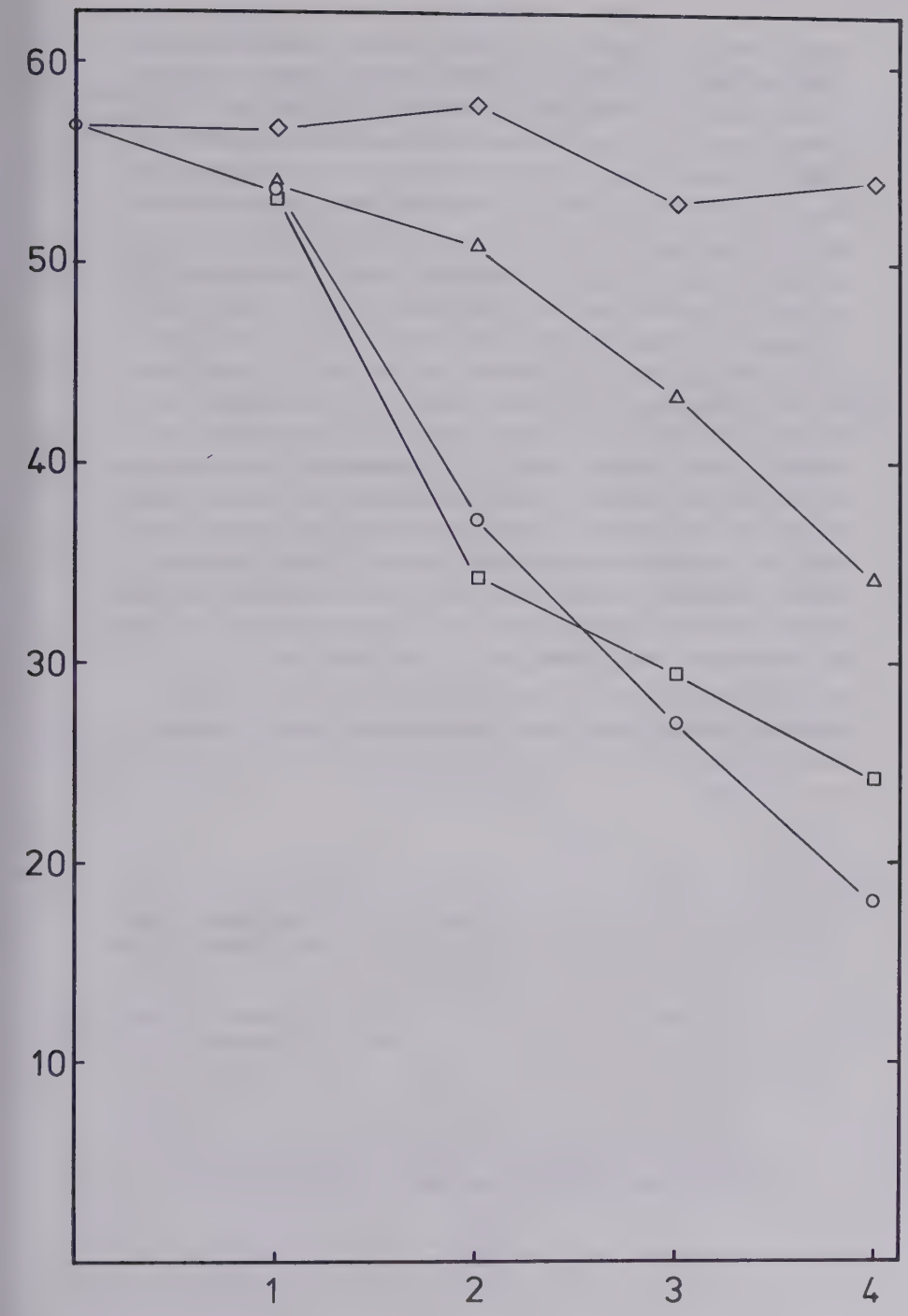
Zur Untersuchung der hormonellen Regulation der G6Pase in L-15-Medium wurde kommerzielles L-15 nach Leibovitz (93) verwendet, das mit 25 mM Bicarbonat (zur Verwendung im CO_2-Brutschrank) sowie mit den bei Kultivierung in W/AB-77-Medium üblichen Supplementen (10 % Kälberserum, 2 mM Glun, Pen/Strep, 5,5 mM Glucose) versetzt wurde (L15(mod.)).

Das Ergebnis einer 4-tägigen Kultivierung in L15-Medium unter verschiedenen Hormonbedingungen ist in Abb. 17 dargestellt. Es zeigt sich ein von den Ergebnissen in W/AB-77 stark abweichendes Bild. Nach einem Tag in der Kultur bleibt eine hohe G6Pase-Aktivität erhalten, die sich zwischen den verschiedenen Hormonbedingungen nur wenig unterscheidet. In der Folge nimmt sie jedoch einen sehr unterschiedlichen Verlauf: Unter Kontrollbedingungen, d.h. in serumhaltigem L 15 ohne Hormonsupplemente, nimmt die Aktivität im weiteren Verlauf deutlich ab; nach 4 Tagen liegt sie bei etwa 30 % der Ausgangsaktivität.

Die Anwesenheit von Dexamethason/T3 führt zu einer deutlichen Verminderung bzw. Verzögerung der Abnahme, so daß nach 4 Tagen eine etwa doppelt so hohe Aktivität wie in den Kontrollen erhalten bleibt. Bei Gabe von Dexamethason/T3/Glucagon wird für den Rest der Kultivierungszeit eine weitgehende Stabilisierung auf dem hohen Niveau der Aktivität nach einem Tag beobachtet.

Abb. 17: Einfluß der Kultivierung in L-15-Medium unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die G6Pase-Aktivität während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Hormone: ○: Kontrolle; △:Dexamethason/T3 (je 10^{-6} M); ◇:Dexamethason/T3/Glucagon (je 10^{-6} M); □:Dexamethason/T3/Glucagon/Insulin (10^{-6} M; 23 mU/ml)
Abszisse: Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)
Ordinate: Kultivierungszeit (Tage)


60
50
40
30
20
10
1
2
3
4

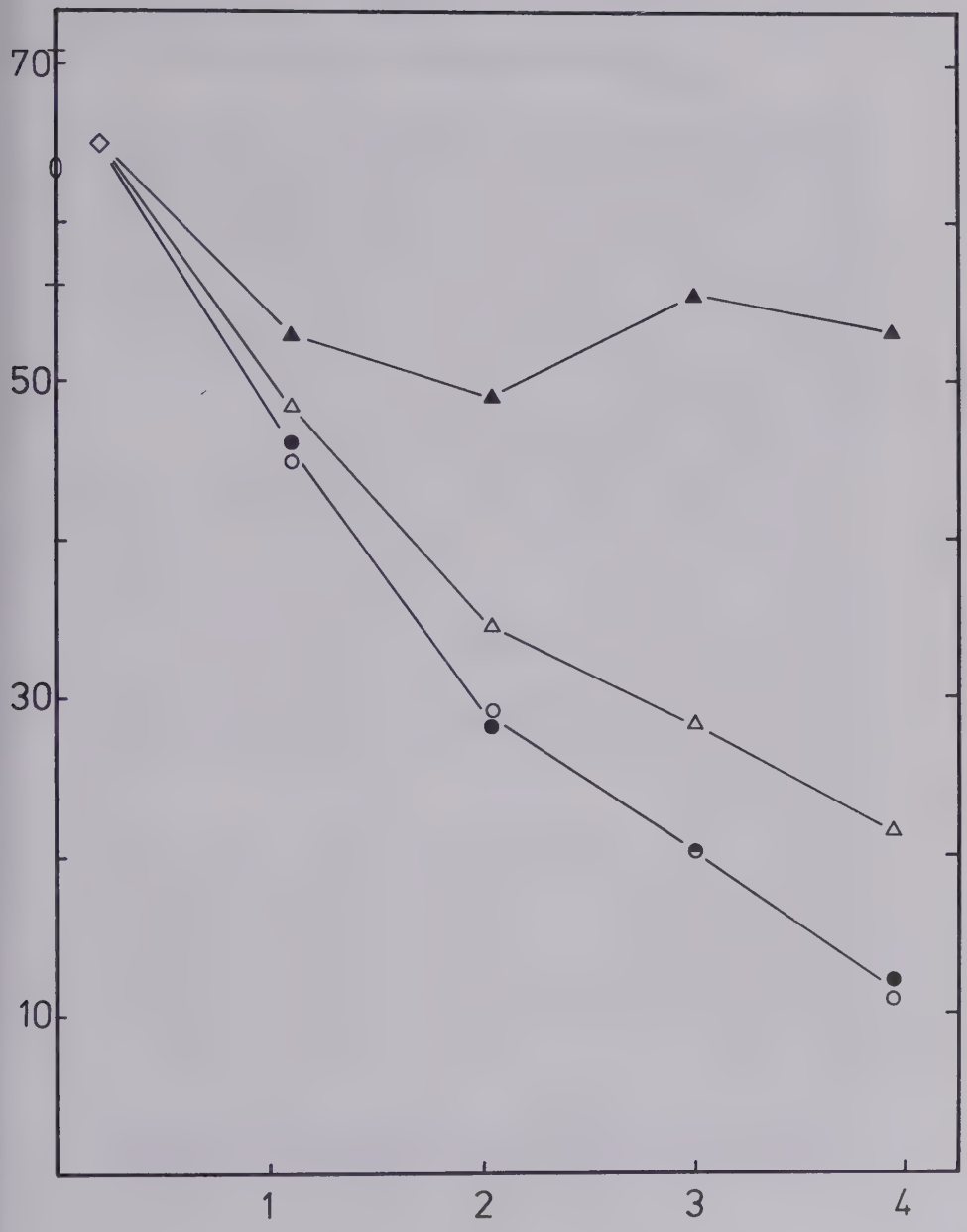
Insulin hebt den stabilisierenden Effekt dieser Hormonkombination weitgehend auf: bei Kultivierung unter Dex/T3/Gluca/Ins zeigt die Aktivität in der Anfangsphase einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolle; danach erscheint die Abnahme verringert, so daß nach 4 Tagen in der Kultur ein um ca. 30 % über der Kontrolle liegender Wert gefunden wird.

Eine direkte Gegenüberstellung des Verlaufs der G6Pase-Aktivität in W/AB-77- und L-15-Medium unter Kontrollbedingungen bzw. in Anwesenheit von Dex/T3/Gluca (DTG) zeigt Abb. 18; hier ist außerdem der Mittelwert (± SEM) der G6Pase-Aktivitäten in frisch isolierten Zellen von 10 verschiedenen Zellpräparationen eingezeichnet. Die Ergebnisse, die an derselben Kultur ermittelt wurden, zeigen nochmals den deutlich verschiedenen Effekt der beiden Medien unter basalen und stimulierenden Bedingungen: Während sich die Kultivierung in L15/DTG als geeignet erweist, die G6Pase-Aktivität der Hepatozyten auf hohem Niveau zu stabilisieren, zeigen dieselben Hormone in W/AB-77 einen nur sehr geringen Effekt, wie dies zuvor bereits für andere Hormonbedingungen gefunden worden war (siehe Abb. 16 und Tab. 8).

Nach diesen Ergebnissen besteht eine offensichtliche Medienabhängigkeit der Wirkung von Hormonen auf die G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten.

Abb. 18: Einfluß der Kultivierung in L-15- und W/AB-77-Medium unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die G6Pase-Aktivität während 4-tägiger Kultivierung (Hepatozyten von gefütterter Ratte)

Hormone: W/AB-77: ○:Kontrolle; ◇:Insulin/Dexamethason (23 mU/ml; 10^{-6} M) ●: Dexamethason/T3/Glucagon (je 10^{-6} M)
L15: △: Kontrolle; ▲:Dexamethason/T3/Glucagon (je 10^{-6} M)
($\bar{x}$ ± s): Mittelwert der G6Pase-Aktivität in frisch isolierten Hepatozyten (N = 10)
Abszisse: Spezifische Aktivität (mU/mg Protein)
Ordinate: Kultivierungszeit (Tage)


70
0
50
30
10
1
2
3
4

3.3.1.3. Einfluß von Medienkomponenten

3.3.1.3.1. Veränderung der Zusammensetzung des W/AB-77-Mediums

Um zu bestimmen, welche(r) Faktor(en) für den unterschiedlichen Einfluß von W/AB-77- bzw. L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität und deren hormonelle Regulation verantwortlich sind, wurde die Medienzusammensetzung von W/AB-77 definiert in Richtung der L15-Zusammensetzung verändert; hierzu wurden Substrate, die ausschließlich in L15 bzw. hier in höheren Konzentrationen als in W/AB-77 vorhanden sind, zu Gruppen zusammengefaßt:

T: Tyr + Ile + Leu (160/100/75 mg/l)
A: Gly + Ala + Ser + Thr (150/200/175/225 mg/l)
B: Arg + Asn (530/250 mg/l)
G: Galactose + myo-Inosit (900/2 mg/ml)
P: Pyruvat (470 mg/l)

(Die Werte in Klammern geben die Konzentrationsdifferenzen der einzelnen Substrate zwischen L15 und W/AB-77 an).

Die Substratspiegel in W/AB-77 wurden durch Zugabe von Aliquots konzentrierter Stammlösungen bzw. direktes Einwiegen schwerer löslicher Substrate auf die entsprechenden Spiegel in L15 angehoben.

Das Ergebnis der mehrtägigen Kultivierung in supplementiertem W/AB-77 ± DTG (Dex/T3/Gluca) ist in Tab. 9 dargestellt; die G6Pase-Aktivität ist in Prozent der Werte angegeben, die in jeweils parallel hierzu in L15/DTG kultivierten Zellen gemessen wurden. Die Hepatozyten wurden gemeinsam in W/AB-77 mit Insulin/Dexamethason abgesetzt und ab dem 1. Medienwechsel (5 h) unter den verschiedenen Medienbedingungen kultiviert.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hat die Veränderung der Medienzusammensetzung durch Zugabe einzelner Substratgruppen (A, B, G, T oder P) keinen signifikanten Einfluß auf die

basale Aktivität: die Werte liegen nach 3 bzw. 4 Tagen in der Kultur bei ca. 30 bzw. 20 % der jeweiligen Aktivitäten in L15/DTG.

Tabelle 9: Einfluß zusätzlicher Substrate in W/AB-77-Medium ± Dexamethason/T3/Glucagon (DTG) auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Dexamethason, T3, Glucagon: 10^{-6} M
Abkürzungen: siehe Text

	Kultivierungszeit (Tage)			
	3		4	
	Relative Aktivität (L15/DTG = 100 %)			
Medium	ohne Hormone	+ DTG	ohne Hormone	+ DTG
L-15	54 ± 7(4)	100	38 ± 10(5)	100
W/AB-77	32 ± 4(3)	38	21 ± 2(4)	22 ± 4(3)
+T	31	38	18	27
+A	36	39	21	28
+G	33	43	21	32
+B		42 ± 3(3)		33 ± 4(3)
+B+A		40		32
+B+T		43		35
+B+G+P		49		43
+B+A+G		51		41
+B+A+G+P+T	36	67 ± 5(4)	23	61 ± 6(4)

Die Anwesenheit von Dex/T3/Gluca führt in den einzeln supplementierten Medien an beiden Tagen zu höheren G6Pase-Aktivitäten, verglichen mit der jeweiligen hormonfreien Kultivierung; diese Werte liegen jedoch nur nach 4 Tagen deutlich über denen in unsupplementiertem W/AB-77/DTG.

Wird W/AB-77 durch Kombinationen der verschiedenen Substratgruppen ergänzt, so werden unter DTG, nicht jedoch in Abwesenheit der Hormone, mit zunehmender Supplementierung höhere G6Pase-Aktivitäten gefunden; maximale Werte von ca. 70 % der Aktivität in L15/DTG werden nur in Anwesenheit aller Substratgruppen beobachtet.

In diesem Zusammenhang wurde nicht näher untersucht, welche Komponenten innerhalb der Substratgruppen, die zum Zwecke des leichteren Identifizierens aktiver Faktoren zusammengestellt worden waren, ohne Einfluß sind; andererseits ergibt sich aus Tab. 9 und nicht gezeigten Ergebnissen mit weiteren Substratgruppen-Kombinationen sowie einzelnen Substraten (z.B. Galactose), daß keiner einzelnen Komponente eine quantitativ besonders bedeutsame Rolle bei der stabilisierenden Wirkung auf die G6Pase-Aktivität zukommt, sondern daß offenbar die Gesamtheit des hohen und komplexen Substratangebotes in diesem Sinne zusammenwirkt.

3.3.1.3.2. Veränderung der Zusammensetzung des L15-Mediums

In Analogie zu den Untersuchungen über den Einfluß der Supplementierung von W/AB-77 mit L15-typischen Substraten bzw. -konzentrationen wurde in L15-Medium der Effekt W/AB-77-typischer Medienkomponenten untersucht.

Wurden die Hepatozyten in mit Lys (117 mg/l)- oder HEPES (10 mM)-supplementiertem L15/DTG kultiviert, so wurde keine Differenz in der G6Pase-Aktivität gegenüber der Kontrolle (L15/DTG) festgestellt.

Die Zugabe einer Vitaminmischung (Ascorbat, Thiamin (je 10 mg/l), Riboflavin (0,9 mg/l), Biotin (0,02 mg/l)) führte zu einer um ca. 10 % verringerten G6Pase-Aktivität nach 3 und 4 Tagen in der Kultur; waren zusätzlich Carnitin und Cholinchlorid anwesend (198 bzw. 13 mg/l), so wurde eine gegenüber unsupplementiertem L15/DTG um ca. 15 % verringerte Aktivität gefunden.

Eine vergleichende Gegenüberstellung des Einflusses der Supplementierung von W/AB-77- bzw. L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität unter basalen und stimulierenden Bedingungen (± Dex/T3/Gluca) zeigt Tab. 10. Um eine möglichst weitgehende Annäherung der Medienzusammensetzung zu erreichen, wurde W/AB-77 mit allen Substraten (A, B, G, P, T, s. oben) und L15 mit RSA/Oleat (2 %/1 mM) sowie der Vitaminmischung (s. oben) und Carnitin/Cholin (s. oben) supplementiert; zum Vergleich wurde eine Kultivierung in supplementiertem W/AB-77 ± RSA/Oleat durchgeführt. Wie die Ergebnisse zeigen, kommt es bei der Kultivierung in supplementiertem L15-Medium zu einer Verringerung sowohl der basalen als auch der mit DTG stimulierten Aktivität, verglichen mit unverändertem L15. In supplementiertem W/AB-77-Medium hat RSA/Oleat (2 %/1 mM) keinen signifikanten Einfluß auf die Basalwerte; unter DTG ist nur am Anfang eine Verminderung der Aktivität im Vergleich zur RSA-freien Kultivierung zu beobachten.

Insgesamt ergibt sich eine weitgehende Annäherung der G6Pase-Aktivitäten, wenn die Hepatozyten in den supplementierten Medien kultiviert werden. Offenbar sind in W/AB-77 Faktoren vorhanden, die zu einer verstärkten Abnahme der Enzymaktivität führen (Vitamine + Carnitin/Cholin + RSA/Oleat), während andererseits in L15 mehrere Substrate (A, B, G, P, T, s. oben), vor allem Aminosäuren und die Substrate Galactose und Pyruvat, in gemeinsamem komplexem Zusammenwirken eine deutliche Stabilisierung der G6Pase-Aktivität in der Kultur bewirken.

Tabelle 10: Einfluß der Supplementierung von L15- und W/AB-77-Medium auf die basale und stimulierte Aktivität der G6Pase bei kultivierten Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Dexamethason, T3, Glucagon: 10^{-6} M
Supplemente: L15: RSA/Oleat (2 %/1 mM) + Vitamine (s. Text) + Carnitin/Cholin; W/AB-77: ± RSA/Oleat (2 %/1 mM) + B + A + G + P + T
(Abkürzungen und Mengenangaben: siehe Text)

		Kultivierungszeit (Tage)		
		2	3	4
Medium		Rel. Aktivität (L15/DTG=100%)		
L15	Kontrolle	70	49	34
	Dex/T3/Gluca	100	100	100
$L15_{suppl.}$	Kontrolle	62	40	29
	Dex/T3/Gluca	77	82	83
$W/AB\text{-}77_{suppl.}$ (ohne RSA/ Oleat)	Kontrolle	52	34	24
	Dex/T3/Gluca	77	76	68
$W/AB\text{-}77_{suppl.}$ (mit RSA/Oleat)	Kontrolle	54	37	23
	Dex/T3/Gluca	69	72	70

3.3.1.4. Lichtmikroskopische Beobachtungen

Im Zusammenhang mit der Darstellung des Einflusses der längerfristigen Kultivierung in supplementierten Medien auf die G6Pase-Aktivität der Hepatozyten seien an dieser Stelle lichtmikroskopische Beobachtungen zur Morphologie der Zellen unter den verschiedenen Medienbedingungen beschrieben.

Hepatozyten, die 3 - 4 Tage in L15/DTG kultiviert wurden, zeigen eine charakteristische Morphologie, die durch ein wenig strukturiertes Zytoplasma und die Anwesenheit einer großen Zahl gallenkanälchenartiger Strukturen an der Zellperipherie gekennzeichnet ist. Die Monolayer als Ganze zeigt ebenfalls ein recht typisches Aussehen: Bei lichtmikroskopischer Betrachtung erscheint sie als in viele sternförmige Zentren gegliedert; von Bereichen mit hoher Zelldichte aus verlaufen stark lichtbrechende Gallekanälchen als verbundene Stränge oder Netze über häufig mehrere Zelllängen radial nach außen. Viele der Canaliculi zeigen einen besonders stark gewundenen Verlauf, andere erscheinen erweitert, teilweise bis zu großen, blasenförmigen Strukturen.

Im Gegensatz hierzu ist die Morphologie der in W/AB-77/DTG kultivierten Hepatozyten durch eine stärkere Strukturierung gekennzeichnet: das Zytoplasma erscheint mehr oder weniger stark granuliert, daneben sind in verschiedenen Zellen vereinzelte bis viele kleine Vakuolen sichtbar, die vermutlich Fetttröpfchen entsprechen. Die Canaliculi sind im allgemeinen weniger stark erweitert als in L15/DTG, vor allem fehlen die blasenförmigen und die stark mäandrischen Formen; sie bilden häufig ausgedehnte Bereiche, in denen die Zellen der Monolayer als von zusammenhängenden Netzen kommunizierender Kanälchen umgeben erscheinen.

Werden die Hepatozyten in supplementiertem W/AB-77/DTG kultiviert, so zeigen sich gegenüber unsupplementiertem Medium typische Veränderungen in der Morphologie kultivierter Zellen; diese betreffen sowohl das Aussehen der einzelnen Zel-

len, als auch das Erscheinungsbild der gesamten Monolayer. Die deutlichste Annäherung an das Aussehen von in L15/DTG kultivierten Hepatozyten wurde in Anwesenheit der Supplemente B + G (Zusammensetzung: s. 3.3.1.3.1.) gefunden: Das Zytoplasma zeigt nur geringe Strukturierung, d.h. verringerte Granulierung bzw. Vakuolisierung; die Canaliculi erscheinen stärker erweitert, mäandrisch und häufig als sternförmig von dichteren Bereichen ausgehend; alle diese Erscheinungen erreichen jedoch nicht das Ausmaß, das die Morphologie unter L15/DTG charakterisiert.

Bei vollständiger Supplementierung des W/AB-77/DTG-Mediums (+A/B/G/P/T), weniger ausgeprägt auch bei alleiniger Zugabe verschiedener Aminosäuren (A, T), wird eine verstärkte Granulierung des Zytoplasmas gegenüber den unsupplementierten Kontrollen beobachtet, während die Ausbildung ausgedehnter Netze von Canaliculi sowie der stark gewundenen und erweiterten Formen erhalten bleibt.

Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen weisen aufgrund der verschiedenen Morphologie auf einen deutlich verschiedenen Zustand der Zellen hin. Dieser drückt sich unter L15/DTG intrazellulär in einem gleichförmigen, wenig strukturiert erscheinenden Zytoplasma, interzellulär in einem charakteristischen Erscheinungsbild der Canaliculi aus, welche einerseits auf eine besonders intensive Wechselwirkung der Zellen (mäandrische Canaliculi), andererseits aber auch auf einen cholestatischen Zustand (erweiterte, teilweise blasenförmige Canaliculi) hinzudeuten scheinen.

Die Veränderungen, die beim Supplementieren von W/AB-77/DTG beobachtet werden, bestätigen die Bedeutung der Medienzusammensetzung unter identischen Hormonbedingungen für die Morphologie der kultivierten Hepatozyten und stehen qualitativ im Einklang mit entsprechenden Änderungen der G6Pase-Aktivität unter diesen Bedingungen. Die Zunahme der Granulierung bei vollständiger Supplementierung von W/AB-77/DTG (+A/B/G/P/T) weist auf eine veränderte Stoffwechselsituation sowohl gegenüber L15/DTG, als auch gegenüber W/AB-77/DTG + B/G hin

(s. oben); diese mag auf das in der Summe besonders hohe Substratangebot oder auf veränderte Relationen zwischen verschiedenen Medienkomponenten zurückzuführen sein.

3.1.3.5. Einfluß der sequentiellen Kultivierung in W/AB-77- und L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten

Zur Klärung der Frage, auf welche Weise die Stabilisierung der G6Pase-Aktivität in L15/DTG zustande kommt, ob sie etwa vor allem auf einer Hemmung der Degradation des Enzyms beruht oder ob eine aktive Enzymsynthese stattfindet, wurde der Einfluß einer sequentiellen Kultivierung in W/AB-77 bzw. L15 untersucht.

Die Zellen wurden nach gemeinsamem Absetzen in W/AB-77 + Insulin/Dexamethason vom ersten Wechsel (4 h) an unter verschiedenen Medien- und Hormonbedingungen kultiviert; Umsetzungen erfolgten nach 2 und 3 Tagen, und die G6Pase-Aktivität wurde 1 und 2 Tage danach ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 dargestellt und jeweils in absoluten und relativen Werten (L15/DTG = 100 %) angegeben.

Hepatozyten, die durchgehend in W/AB-77 kultiviert wurden, zeigen nach 3 und 4 Tagen unter allen Hormonbedingungen eine nur geringe G6Pase-Aktivität; dabei werden unter Glucagon und Insulin etwas höhere, unter Dexamethason deutlich niedrigere Werte als unter Kontrollbedingungen gefunden (siehe auch Abb. 16 und Tab. 8). Wurden diese Zellen nach 2 Tagen auf L15/DTG umgesetzt, so wurden bereits 1 Tag später deutlich höhere Aktivitäten als nach durchgehender Kultivierung in W/AB-77 gefunden; während des 2. Tages nach dem Umsetzen steigt die Aktivität weiter deutlich an, so daß danach in Abhängigkeit von der Vorbehandlung 70 - 90 % der Werte von Zellen erreicht werden, die durchgehend in L15/DTG kultiviert wurden. Erfolgt der Wechsel auf L15/DTG nach 3 Tagen, so werden 1 Tag später Aktivitäten gemessen,

Tabelle 11: Einfluß der sequentiellen Kultivierung in W/AB-77- bzw. L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Dexamethason/T3/Glucagon: 10^{-6} M; Insulin: 23 mU/ml
Abkürzungen: DTG: Dexamethason/T3/Glucagon; K: Kontrolle; a) Umsetzen nach 2 Tagen; b) Umsetzen nach 3 Tagen

	(Kultivierungszeit (Tage)	
	3	4
Medium	Aktivität (mU/mg Prot.; (% L15/DTG)	
W/AB-77		
Kontrolle	14,9 (29)	9,8 (22)
K →L15/DTG	a) 26,1 (51)	a) 39,2 (89) b) 19,4 (44)
Gluca	19,0 (37)	11,9 (27)
Gluca →L15/DTG	a) 24,1 (48)	a) 30,8 (70) b) 19,7 (45)
Ins	16,2 (32)	11,4 (26)
Ins →L15/DTG	a) 21,2 (42)	a) 33,7 (76) b) 14,6 (33)
Dex	13,0 (26)	6,5 (15)
Dex →L15/DTG	a) 24,0 (47)	a) 32,7 (74) b) 18,0 (41)
L15		
Kontrolle	32,5 (64)	23,8 (54)
K →W/AB-77/ DTG	a) 26,2 (52)	a) 13,9 (32)
Dex/T3/Gluca	50,7 (100)	44,1 (100)
DTG →W/AB-77/ DTG	a) 28,4 (56)	a) 14,5 (33)

die im allgemeinen über den Ausgangswerten zum Zeitpunkt des Umsetzens liegen. Eine Ausnahme bildet die Vorbehandlung mit Insulin: hier liegt sie unter dem Ausgangswert, aber über dem Wert ohne Umsetzen; dies scheint einen unterschiedli-

chen Effekt von Insulin auf die G6Pase in Abhängigkeit vom jeweiligen Enzymspiegel zu bestätigen: bei sehr niedrigen Aktivitäten wirkt dieses Hormon leicht stabilisierend (siehe auch Tab. 8), während es den stabilisierenden oder stimulierenden Einfluß von L15/DTG teilweise zu unterdrücken vermag, siehe Abb. 17. Dieser negative Effekt der Vorbehandlung mit Insulin ist hier nur während des 1. Tages nach dem Umsetzen auf L15/DTG zu beobachten; während des 2. Tages wird dagegen eine ähnlich hohe Aktivitätszunahme gefunden wie nach Vorbehandlung unter Kontrollbedingungen.

Hepatozyten, die nach 3 Tagen von W/AB-77 auf L15/DTG umgesetzt wurden, zeigen im Zeitraum zwischen 72 und 96 Stunden einen, bezogen auf die jeweiligen Ausgangswerte, geringeren Anstieg der Aktivität als bereits am 2. Tag umgesetzte Zellen; der stabilisierende Einfluß liegt jedoch, bezogen auf die Werte in nicht umgesetzten Zellen, mit Ausnahme der Vorbehandlung mit Insulin, in demselben Bereich, wie er bei den früher umgesetzten Zellen nach 1 Tag gefunden wurde (ca. 10 mU/mg Protein).

Nach dem Umsetzen von L15 ± DTG auf W/AB-77 ± DTG nimmt die Aktivität im weiteren Verlauf der Kultivierung in beiden Fällen stark ab; diese Abnahme ist während des 1. Tages nach dem Wechsel von L15/DTG auf W/AB-77/DTG besonders stark ausgeprägt, aber in beiden Fällen ist sie auch während des 2. Tages größer als unter den übrigen Kulturbedingungen; die Aktivität unterscheidet sich danach nur noch wenig von den niedrigen Werten der durchgehend in W/AB-77 kultivierten Zellen (32 %, gegenüber 22 - 27 % der Aktivität in L15/DTG).

Diese Ergebnisse bestätigen den deutlich unterschiedlichen Einfluß der beiden Medien auf die G6Pase-Aktivität in den kultivierten Zellen, wie er zuvor bereits für gleichbleibende Kulturbedingungen beschrieben wurde (Abb. 18): Während in L15/DTG eine hohe Aktivität aufrechterhalten bleibt und auch in L15 ohne DTG nach 3 und 4 Tagen noch relativ hohe Werte gefunden werden, führt die Kultivierung in nicht-supplementiertem W/AB-77 auch in Anwesenheit von DTG zu einem starken Aktivitätsverlust.

3.3.1.6. Einfluß der Medienglucose auf die G6Pase-Aktivität

In vivo-Untersuchungen haben gezeigt, daß die G6Pase-Aktivität in der Leber durch den Kohlenhydratanteil in der Nahrung beeinflußt wird (111): Sie ist bei Fructose-, Saccharose- oder Galactosediät erhöht (4,19,41), unter Maltose-Diät erniedrigt (19). Wie diese Effekte im einzelnen zustande kommen, ist ungeklärt; im Falle der Fructose wurde eine verringerte Michaelis-Konstante (K_m) für G6P gefunden (41).

Der Nachweis einer direkten Wirkung einzelner Nahrungskomponenten wird in vivo wegen der gleichzeitigen Beeinflussung der Blutspiegel verschiedener Hormone und der allgemeinen Wechselwirkungen zwischen Leber und übrigen Geweben erschwert; da diese komplizierenden Einflüsse in Primärkulturen von Hepatozyten ausgeschaltet sind, erscheint dieses in vitro-System zur Untersuchung solcher direkten Effekte auf die Leber als besonders geeignet.

Von einzelnen Autoren wurde die Abnahme der G6Pase-Aktivität in Hepatozyten-Primärkulturen auf die Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen im Medium zurückgeführt (109,155), ohne daß ein solcher Effekt jedoch direkt nachgewiesen worden wäre. Zur Untersuchung eines direkten Einflusses von Glucose auf die G6Pase-Aktivität wurden Hepatozyten in W/AB-77- bzw. L15-Medium (s. 3.3.1.2.) unter verschiedenen Hormonbedingungen in Anwesenheit unterschiedlicher Glucosekonzentrationen kultiviert: a) in glucosearmem Medium (0,3 mM Glucose, aus dem Serumanteil); b) unter normaler Glucosekonzentration (5,5 mM); c) unter hoher Glucose (11 mM).

3.3.1.6.1. Glucose-Einfluß in L15-Medium

Die Ergebnisse der Kultivierung in glucosearmem, normalem und glucosereichem L15-Medium unter verschiedenen Hormonbedingungen sind in Tab. 12 dargestellt; die Aktivitäten sind in Prozenten der jeweiligen Werte im Normalmedium (5,5 mM Glucose) angegeben.

Nach 1-tägiger Kultivierung (nicht gezeigt) ist kein eindeutiger Effekt der verschiedenen Glucosekonzentrationen festzustellen; zu diesem Zeitpunkt sind in L15-Medium auch noch keine deutlichen Einflüsse der unterschiedlichen Hormonbedingungen auf die G6Pase-Aktivität erkennbar (siehe

Tabelle 12: Einfluß unterschiedlicher Glucosekonzentrationen unter verschiedenen Hormonbedingungen in L15-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Dexamethason/T3/Glucagon: 10^{-6} M
Abkürzungen: A: glucosearmes Medium (Anfangskonzentration 0,3 mM); N: Normalmedium (5,5 mM Glucose); H: hohe Glucose (11 mM)

		Kultivierungszeit (Tage)			
		1	2	3	4
Hormone		Relative Aktivität (N = 100 %)			
Kontrolle	A	102	95	84	100
	N	100	100	100	100
	H	94	109	96	121
Dex/T3	A	107	79	81	79
	N	100	100	100	100
	H	107	117	120	126
Dex/T3/ Gluca	A	101	82	77	76
	N	100	100	100	100
	H	108	114	112	117
Dex/T3/ Gluca/Ins	A	101	104	90	94
	N	100	100	100	100
	H	108	111	103	112

Abb. 17). Im weiteren Verlauf der Kultivierung zeigt sich in Abhängigkeit von den jeweiligen Hormonbedingungen ein unterschiedlich stark ausgeprägter Effekt der Glucosekonzentration. Allgemein läßt sich feststellen, daß die Kultivierung unter hoher Glucose (11 mM) zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Stabilisierung der G6Pase-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen führt, während in glucosearmem Medium (0,3 mM) unter ansonsten gleichen Medienbedingungen allgemein niedrigere Werte gefunden werden. Die Differenzen sind unter Hormonbedingungen, die zu einem stärkeren Verlust der Aktivität führen (Kontrolle, Dex/T3/Gluca/Ins, siehe Abb. 17), sowohl in absoluten Werten als auch in Relation zu den Kontrollen (5,5 mM Glucose) nur gering, während sich unter Bedingungen, die zu einer Stabilisierung der G6Pase-Aktivität führen (Dex/T3; Dex/T3/Gluca, siehe Abb. 17), ein positiver Glucoseeffekt gefunden wird, der beim direkten Vergleich der Werte unter glucosearmer mit denen unter glucosereicher Kultivierung besonders deutlich wird.

3.3.1.6.2. Glucose-Einfluß in W/AB-77-Medium

Der Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf die G6Pase-Aktivität der Hepatozyten in W/AB-77 wurde in supplementiertem Medium (+A/B/G/P/T, siehe Kap. 3.3.1.3.1.) in Anwesenheit von Dex/T3/Gluca (DTG) untersucht, d.h. unter Bedingungen, die zu einer relativen Stabilisierung der Enzymaktivität führen (siehe Tab. 9). In unsupplementiertem W/AB-77 (nicht gezeigt) sind die Werte nach 3 und 4 Tagen Kultivierung mit bzw. ohne Glucose nicht signifikant verschieden: Die Differenzen liegen bei den zu diesem Zeitpunkt noch vorhandenen sehr geringen G6Pase-Aktivitäten (siehe Abb. 16) wegen der dann in der gleichen Größenordnung liegenden Korrekturen für die unspezifische Phosphatase (siehe Kap. 3.3.1.1.) im Rahmen der Meßungenauigkeit.

Wie die Tab. 13 zeigt, ist der positive Effekt höherer Glucosekonzentrationen auf die G6Pase-Aktivität auch in W/AB-77 nachzuweisen; besonders deutlich wird der Einfluß, wenn die Werte nach Kultivierung in glucosearmem mit denen in glucosereichem Medium verglichen werden: die Differenz beträgt ca. 15 - 20 % der Werte unter Kontrollbedingungen (5,5 mM Glucose).

Tabelle 13: Einfluß unterschiedlicher Glucosekonzentrationen in supplementiertem W/AB-77-Medium auf die G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte

Hormone: Dexamethason/T3/Glucagon: je 10^{-6} M
Supplemente in W/AB-77: siehe Text
Abkürzungen: A, N, H: siehe Tab. 12

		Kultivierungszeit (Tage)	
		3	4
Medium		Rel. Aktivität (N = 100 %)	
W/AB-77 suppl. + Dex/T3/Gluca	A	92	85
	N	100	100
	H	114	105

3.3.2. Zytochemische Lokalisierung der G6Pase in der Hepatozyten-Monolayer

Zytochemische Untersuchungen wurden mit dem Ziel vorgenommen, die Aktivitätsverteilung der G6Pase zwischen den einzelnen Zellen der Hepatozyten-Monolayer direkt beobachten und deren Veränderungen während der Kultivierung verfolgen zu können. Die in Kap. 2.8. beschriebene Vorgehensweise erlaubt es, die Zellen während der gesamten Prozedur an ihrem ursprünglichen Ort innerhalb der Monolayer zu belassen, eine gute Strukturerhaltung zu erreichen und eine direkte lichtmikroskopische Beobachtung und Dokumentation der zytochemischen Reaktion vorzunehmen.

Die zytochemischen Studien zur G6Pase-Verteilung innerhalb der Layer, die an mehreren Primärkulturen von Hepatozyten aus gefütterter Ratte durchgeführt wurden, ergaben folgende Resultate:
Zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels, hier nach etwa 3 h in der Kultur, zeigen die noch nicht vollständig ausgebreiteten Zellen eine deutlich unterschiedliche Enzymausstattung, siehe Bild 1; diese Heterogenität ist aufgrund der ungleichen Aktivitätsverteilung der G6Pase innerhalb des Leberazinus in vivo - periportal werden höhere Aktivitäten gefunden als perivenös (80,123) - zu erwarten.

Im weiteren Verlauf der Kultur zeigen die Hepatozyten bei lichtmikroskopischer Betrachtung in Abhängigkeit von den Medienbedingungen und der Kultivierungszeit ein quantitativ, d.h. im Hinblick auf die Intensität, und qualitativ, d.h. bzgl. der Verteilung innerhalb der Layer, unterschiedliches Erscheinungsbild der zytochemischen Reaktion:
Unter Medienbedingungen, welche die G6Pase-Aktivität nicht zu stabilisieren vermögen (W/AB-77 ± Hormone; L15 ohne Hormone), kommt es mit zunehmender Kulturdauer zu einer allgemeinen Abnahme der Intensität der zytochemischen Anfärbung (Braunfärbung) der Zellen; gleichzeitig bleibt jedoch über mehrere Tage eine heterogene Verteilung der Enzymaktivität innerhalb der Layer sichtbar; intensiv gefärbte einzelne

Zellen oder Zellgruppen liegen in direkter Nachbarschaft zu deutlich weniger reaktiven Zellen. Eine heterogene Verteilung läßt sich unter diesen Medienbedingungen im allgemeinen nur bis zum 3. Tag feststellen, wobei die Zahl der Hepatozyten, die sich durch intensivere zytochemische Reaktion deutlich von der Umgebung abheben, abnimmt, so daß zu diesem Zeitpunkt häufig nur noch vereinzelt liegende Zellen mit höherer Aktivität in einer Umgebung mit weitgehend homogener, niedriger Intensität zu beobachten sind (Bild 2). Nach 4 Tagen läßt sich in diesen Medien kein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen den einzelnen Hepatozyten innerhalb der Monolayer feststellen (Bild 3 und 4); kleinere noch vorhandene Heterogenitäten mögen wegen der zu diesem Zeitpunkt nur noch geringen nachweisbaren G6Pase-Aktivität lichtmikroskopisch nicht mehr differenzierbar sein.

Im Gegensatz hierzu bleibt unter Medienbedingungen, welche die Enzymaktivität zu stabilisieren vermögen (L15/DTG; supplementiertes W/AB-77/DTG, siehe Kap. 3.3.1.2.), während des gesamten Kultivierungszeitraumes von 4 Tagen eine deutlich erkennbare Heterogenität erhalten (Bild 5 und 6). Aufgrund der unterschiedlichen Fläche und der damit verbundenen verschiedenen Schichtdicke der einzelnen Hepatozyten innerhalb der Monolayer ist eine genauere Quantifizierung nicht möglich, aber aus den bei Zellen mit ähnlicher Fläche beobachteten deutlichen Intensitätsdifferenzen läßt sich auf signifikante Unterschiede in der Enzymaktivität schließen. Die zytochemische Reaktion ist unter diesen Bedingun-

---

Bilder 1-6: Verteilung der G6Pase-Aktivität innerhalb der Hepatozyten-Monolayer
(Fixation: Bild 1: 10 min; Bild 2-4: 2 min; Bild 5,6: 1 min; Inkubation: Bild 1: 30 min; Bild 2-6: 1 h)

Bild 1: W/AB-77 + Ins/Dex (23 mU/ml; 10^{-6} M); 3 h
Bild 2: W/AB-77 ohne Hormonsupplemente; 50 h
Bild 3: W/AB-77 ohne Hormonsupplemente; 94 h
Bild 4: L15 (mod.) ohne Hormonsupplemente; 94 h
Bild 5: L15 (mod.) + Dex/T3/Gluca (je 10^{-6} M); 94 h
Bild 6: W/AB-77 (suppl.) + Dex/T3/Gluca (je 10^{-6} M); 94 h

Bild 1

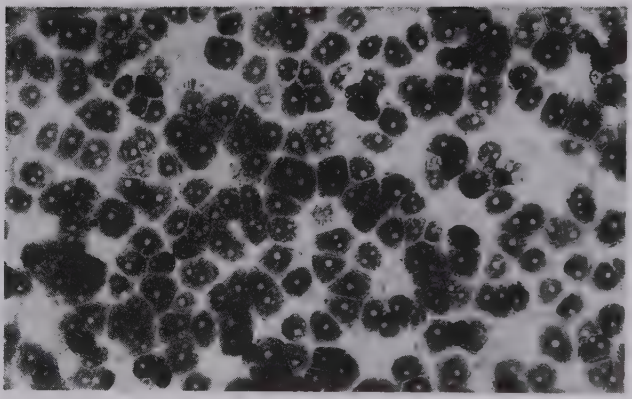


Bild 2

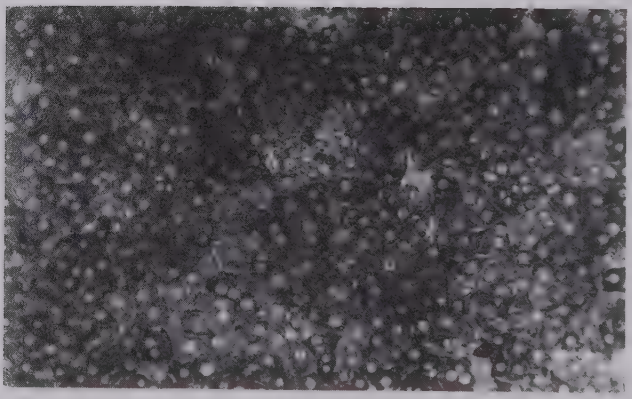


Bild 3

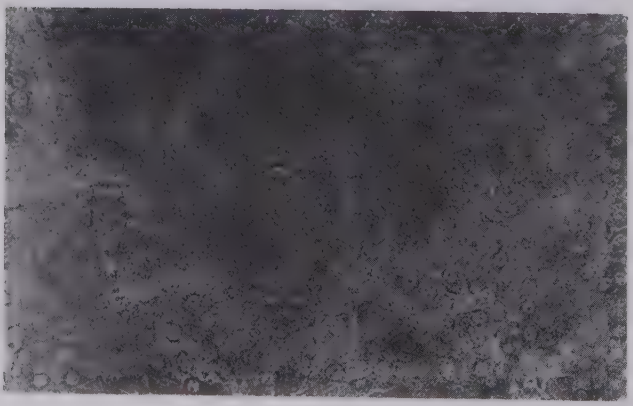


Bild 4

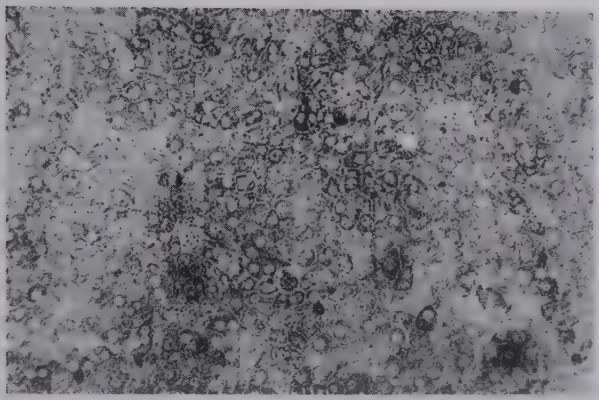


Bild 5

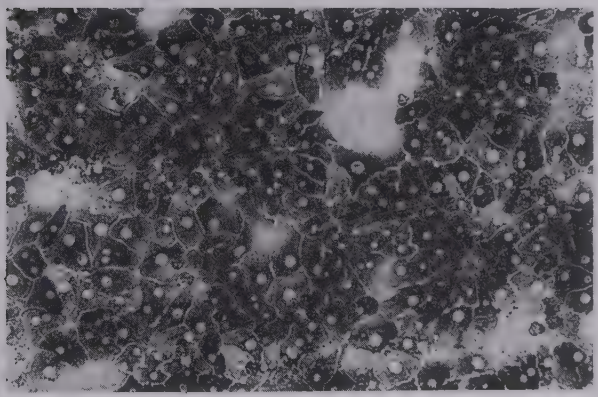
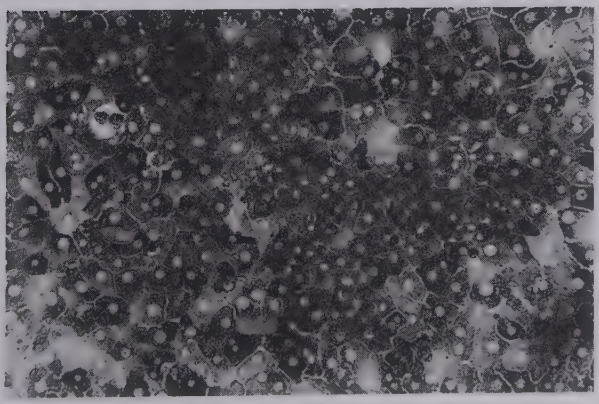


Bild 6



gen, wie aufgrund der biochemischen Messungen zu erwarten, durchgehend stärker ausgeprägt als unter nicht-stabilisierenden Bedingungen; gleichzeitig ist auch die Zahl der intensiver gefärbten Zellen innerhalb der Layer höher als unter diesen Medienbedingungen. Hepatozyten mit besonders intensiver zytochemischer Reaktion werden häufig in Bereichen mit stark erweiterten Canaliculi gefunden (siehe Kap. 3.3.1.4.); dies ist vor allem in L15/DTG der Fall. Die an diesen Stellen im allgemeinen höhere Zelldichte und damit verbundene größere Schichtdicke erscheint nicht ausreichend, um die deutlichen Intensitätsdifferenzen gegenüber benachbarten Zellen zu erklären. In diesen Fällen ist teilweise auch eine inhomogene intrazelluläre Verteilung der G6Pase-Aktivität zu beobachten: Die Zytoplasmabereiche in direkter Nachbarschaft zu den Canaliculi zeigen eine stärkere zytochemische Reaktion als die übrigen Bereiche derselben Zelle.

Diese Beobachtungen könnten einen Ansatzpunkt für die Erklärung der unterschiedlichen Effekte verschiedener Medien auf die G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten darstellen: Die bereits in Kap. 3.3.1.4. näher beschriebene typische Morphologie der Zellen unter L15/DTG läßt auf einen besonders engen Kontakt in den Bereichen mit mäandrischen bzw. erweiterten Canaliculi schließen, da diese die Ausbildung dichter 'tight junctions' zur Voraussetzung haben; da hier auch eine besonders hohe G6Pase-Aktivität nachgewiesen werden kann, scheinen diese Bedingungen, die einen Cholestase-ähnlichen Zustand der Zellen zu bewirken vermögen, die Aufrechterhaltung einer hohen G6Pase-Aktivität zu begünstigen.

Bei Kontrollinkubationen unter ß-Glycerophosphat an Stelle von G6P zeigte die gesamte Monolayer, unabhängig von der Medien- und Hormon-Vorbehandlung, eine äußerst geringe Intensität der zytochemischen Reaktion und keine feststellbare Heterogenität zwischen den einzelnen Zellen.

4. DISKUSSION

4.1. Glykogen

Die Glykogenspiegel frisch isolierter Hepatozyten vom gefütterten Tier können sich zwischen verschiedenen Präparationen recht deutlich unterscheiden (s. Kap. 3.1.1.1.). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 164 ± 43 µg Glykogen/mg Protein (N = 17) ermittelt; ähnliche Werte wurden von Bernaert et al. (7) angegeben: 143 ± 55 µg/mg. In Hepatozyten vom gehungerten Tier war allgemein kein Glykogen nachweisbar, da die geringen, nach einer Nüchternperiode von ca. 20 h noch vorhandenen Glykogenreserven während der Isolierungsprozedur abgebaut werden (133).

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Autoren (7) ist die Anfangsphase der Kultur durch eine ausgeprägte Glykogenolyse gekennzeichnet, während der Hepatozyten vom gefütterten Tier den am Ende der Isolierungsphase noch vorhandenen Glykogengehalt weitgehend verlieren; dieser Verlust kann nur durch unphysiologisch hohe Glukosekonzentrationen (> 20 mM) in Anwesenheit von Insulin/Dexamethason unterdrückt werden. Die initiale Glykogenolyse, die mit einer verringerten Hormonantwort auf die Stimulation durch Insulin verbunden ist, muß auf die erhöhten Anforderungen der in vitro-Bedingungen an die kultivierten Hepatozyten zurückgeführt werden: Im Rahmen der Erholung von den Beeinträchtigungen der Isolierungsprozedur und der Ausbildung der Monolayer, die mit einer Umorganisation vor allem der Zelloberfläche verbunden ist (26,153), besteht offenbar ein erhöhter Energiebedarf, der bevorzugt über den Abbau der Glykogenreserven gedeckt wird.

Da in Anwesenheit von Insulin von Beginn der Kultivierung an eine Aktivierung der Glykogensynthase gefunden wurde (7), scheint die in der Anfangsphase beobachtete verminderte (s. Tab. 1) bis fehlende (7) Hormonantwort auf die Stimula-

tion durch Insulin nicht auf eine während der enzymatischen Dissoziation der Zellen mögliche Beeinträchtigung von Rezeptoren oder die in dieser Phase beobachtete verstärkte Degradation des Hormons zurückzuführen zu sein.

Die Aktivierung der Glykogensynthese bei gleichzeitig ablaufender Glykogenolyse deutet auf das Vorhandensein eines "futile cycles" und damit auf eine vorübergehende Dysregulation des Glykogenstoffwechsels hin, da der in vivo und in vitro nachgewiesene Mechanismus der gegenseitigen Beeinflussung von Glykogensynthese und Glykogenolyse normalerweise einen futile cycle ausschließt (s. Einleitung, Kap. 1.2.).

Die im weiteren Verlauf der Kultivierung beobachtete Stimulation des Glykogenaufbaus durch Insulin ist stark von der Anwesenheit von Dexamethason abhängig. Da Dex selbst keine erhöhte Glykogenbildung induziert, zeigt dies einen permissiven Effekt des Glucocorticoids auf die Insulinwirkung an. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen an Primärkulturen, die einen permissiven Effekt der Glucocorticoide auf die Insulin-abhängige Induktion der für die Glykogensynthese limitierenden Enzyme Glucokinase (127) und Glykogensynthase (129) zeigten; neben einer Stimulation der Glykogensynthese äußert sich die Wirkung hierbei auch in einem deutlichen Absenken der hohen in-vitro-Glucoseschwelle (128).

Glucagon bewirkt in der Anfangsphase der Kultur eine ausgeprägte Glykogenolyse, auch in Anwesenheit von Insulin/Dexamethason und hoher Glucosekonzentration (s. Tab. 2). Danach überwiegt in Anwesenheit von Ins/Dex der glykogene Einfluß der glucagonstimulierten Gluconeogenese aus den Substraten des Kultur- bzw. Inkubationsmediums, so daß es zu einem Wiederanstieg des Glykogenspiegels kommt, der in Anwesenheit zusätzlicher gluconeogenetischer Substrate wie Pyruvat/Lactat und Fructose (s. Tab. 3) besonders stark ausgeprägt ist.

Die stimulierenden Wirkungen dieser gluconeogenetischen Substrate auf die Glykogenspiegel der kultivierten Hepatozyten kann nicht auf eine Zunahme der Glucosekonzentration im Medium zurückgeführt werden, da sich diese zwischen den verschiedenen Substratbedingungen (± Pyr/Lac, ± Fructose) nur wenig unterscheiden (maximal 30 %) und nach den Ergebnissen über den Einfluß der Medienglucose (s. Tab. 2) sehr viel höhere Glucosekonzentrationen erforderlich sind, um entsprechend große Änderungen zu erreichen. Die Zunahme der Glykogenwerte deutet daher auf eine bevorzugte Verwendung gluconeogenetischer Substrate für die Glykogenese hin, die unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen (Ins/Dex/Gluca) besonders deutlich wird. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Resultaten entsprechender Untersuchungen an perfundierter Leber (59) und isolierten Hepatozyten (79,135), wonach gluconeogenetische Substrate gegenüber Glucose bevorzugte Substrate für die Glykogensynthese darstellen und externe Glucose als glykogenes Signal wirkt für eine Umsteuerung des Substratflusses gluconeogenetisch gebildeten Hexosephosphats von der Freisetzung als Glucose hin zur Glykogensynthese.

Der im Vergleich mit Pyruvat/Lactat stärkere glykogene Einfluß der Fructose, der unter Kontrollbedingungen und Insulin während der gesamten Kultivierungszeit und unter Ins/Dex/Gluca während der glykogenolytischen Anfangsphase beobachtet wurde (s. Tab. 3), scheint nicht auf einem höheren gluconeogenetischen Substratfluß zu beruhen, da unter Pyr/Lac aufgrund der hohen Substratkonzentrationen (1,5/15 mM) eine höhere Glucosebildung gefunden wurde als unter Fructose (2 mM). Dieser stärker glykogene bzw. anti-glykogenolytische Effekt der Fructose ist vermutlich auf einen direkten aktivierenden Einfluß auf die Glykogensynthase zurückzuführen (68,79), über den dieses Substrat, unabhängig von seiner Eigenschaft als Glykogenvorstufe, die Synthese zu stimulieren vermag.

Die Bedeutung des gluconeogenetischen Substratflusses für die Glykogensynthese wird unter Inkubationsbedingungen be-

sonders deutlich (s. Abb. 1). Trotz niedriger externer Glucosekonzentrationen (Anfangskonzentration ca. 0,4 mM, Endkonzentration bis ca. 3 mM) werden unter Gluconeogenese-stimulierenden Bedingungen (Glucagon + Pyr/Lac) allgemein (außer nach Insulin/Dexamethason-Vorbehandlung, s. Abb. 1) höhere Glykogenspiegel erreicht als unter Kulturbedingungen, d.h. unter durchgehend höheren externen Glucosekonzentrationen.

Die zwischen dem 3. und 4. Kulturtag beobachtete Abnahme des Glykogengehaltes kann im Fall der unter nicht-stimulierenden Bedingungen kultivierten Hepatozyten (Normalmedium, ohne Ins/Dex, ohne supplementierte gluconeogenetische Substrate) auf die Veränderung der Zellen in Richtung eines glykolytischen Zustands (s. Kap. 3.2.) zurückgeführt werden, die zu einer zunehmenden Abnahme der Glucosekonzentration im Medium führt. Im Fall der unter stimulierenden Bedingungen (hohe Glucose, Ins/Dex, Ins/Dex/Gluca + gluconeogenetische Substrate) kultivierten Zellen könnte diese Abnahme auf eine von Bernaert et al. (7) beschriebene Ausbildung von Glykogen-degradierenden Autophagosomen zurückzuführen sein, die nach drei Tagen unter Insulin und hoher Glucose beobachtet wurde und einem Phosphorylase-unabhängigen lysosomalen Glykogenabbau zu entsprechen scheinen (7).

4.2. Gluconeogenese

4.2.1. Einfluß der Inkubationsbedingungen auf Harnstoffsynthese und Glucosebilanz

Bei den Untersuchungen zum Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Höhe der Harnstoffsynthese wurde bei Hepatozyten von gefütterter und gehungerter Ratte eine Reihenfolge Pyruvat/Lactat < Kontrolle < Glucagon + Pyruvat/Lactat < Glucagon gefunden. Diese Ergebnisse zeigten einen deutli-

chen stimulierenden Einfluß von Glucagon auf die Harnstoffsynthese. Das Ausmaß der Stimulation nahm dabei relativ zu den Kontrollen im Laufe der 4-tägigen Kultiverung zu: von ca. 30 % auf 70 % bei Hungerratten-Hepatozyten, von 25 % auf 55 % bei Hepatozyten vom gefütterten Tier. Diese Zunahme des stimulierenden Effektes kam aufgrund der relativ stärkeren Abnahme der Harnstoffbildung unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu der unter Glucagon zustande: hier werden nach 4 Tagen noch 75 % (gefütterte Ratten-Hepatozyten) bzw. 90 % (Hungerratten-Hepatozyten) der Werte vom 1. Tag gemessen, während die entsprechenden Kontrollwerte bei 70 % der Ausgangswerte lagen. Unter den gegebenen Kulturbedingungen, d.h. unter Insulin/Dexamethason, wird also die Kapazität zur stimulierten Harnstoffsynthese über mehrere Tage auf hohem Niveau erhalten, während die basale Harnstoffsynthese in demselben Zeitraum deutlich stärker zurückgeht. Dieser Rückgang kann auf die permanente Anwesenheit von Insulin zurückgeführt werden, während die Stabilisierung der Glucagonantwort vermutlich auf der gleichzeitigen Anwesenheit von Dexamethason beruht: Glucocorticoide üben einen potenzierenden (permissiven) Einfluß auf die Glucagon-Stimulation des Aminosäuretransportes aus (84,86). Außerdem vermögen sie in vivo alle 5 Enzyme des Harnstoffzyklus zu induzieren (125). Nach den Untersuchungen von Gebhardt (45) können diese Enzyme auch in der Kultur durch Glucagon induziert werden, wobei Dexamethason permissiv auf die Induktion wirkt, alleine also nur einen geringen Effekt ausübt.

Die Ergebnisse zum Einfluß verschiedener Inkubationsbedingungen auf die Harnstoffsynthese zeigten bei gefütterter und gehungerter Ratte neben dem zuvor beschriebenen stimulierenden Effekt des Glucagons auch einen deutlichen und während der gesamten Kulturdauer feststellbaren vermindernden Einfluß der Lactat-Konzentration (Pyruvat/Lactat) auf die basale und glucagon-stimulierte Harnstoffsynthese. Dieser Effekt kontrastiert mit Ergebnissen zum Einfluß von Lactat auf die Harnstoffsynthese aus Ammoniak, die an isolierten Rattenhepatozyten gewonnen wurden. Dabei wurde eine

deutliche Stimulation der Synthese beobachtet, die sich mit der Vorläuferrolle des Lactats für die Überträgersubstrate Glutamat und Aspartat (siehe Kap. 1.3.) erklären läßt (89), die in frisch isolierten Zellen erniedrigt sind. Die Frage, ob sich die Harnstoffsynthese aus Aminosäuren, die immer niedriger ist als die aus Ammoniak (89), ebenfalls durch Lactat stimulieren läßt, wurde dort nicht untersucht. Unbekannt ist auch, ob kultivierte Zellen ebenfalls limitierende Spiegel dieser Substrate enthalten. Das Fehlen einer solchen Limitierung würde jedoch nicht den deutlichen suppressiven Einfluß der Anwesenheit von Pyruvat/Lactat erklären. Stattdessen könnte dieser Effekt auf die Konkurrenz metabolisierbarer Substrate zurückzuführen sein. Unter den gegebenen Inkubationsbedingungen werden Aminosäuren des Mediums verstärkt umgesetzt, da sie neben der niedrigen Glucosemenge und den übrigen Substraten aus dem Serumanteil (Fettsäuren, Lactat) als einzige metabolisierbare Substrate zur Verfügung stehen. In Anwesenheit von Pyr/Lac treten diese als metabolisierbare Substrate für Endoxidation und Gluconeogenese mit den Aminosäuren in Konkurrenz und vermindern deren Umsatz. Eine ähnliche Wirkung könnte auch dem geringeren, die Harnstoffsynthese senkenden Einfluß von Glucose zugrunde liegen (Abb. 7).

Beim Vergleich der Glucosebilanz unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wurden bei Hepatozyten aus gefütterter Ratte durchgehend niedrigere Werte gefunden als bei den Hepatozyten vom gehungerten Tier. Die Unterschiede waren in Anwesenheit von Glucagon (Gluca, Gluca + Pyr/Lac) besonders ausgeprägt, siehe Tab. 4 und Abb. 6. Im Hinblick auf eine Interpretation als Folge von Unterschieden in Gluconeogenese und/oder Glucosemetabolismus erscheint ein Vergleich der glucagonabhängigen Stimulation der Harnstoffsynthese sowie der Relation zwischen glucagoninduzierter Harnstoffsynthese und der gleichzeitigen Veränderung der Glucosebilanz aufschlußreich. Aminosäuren sind unter den gegebenen Inkubationsbedingungen, d.h. in Abwesenheit von Pyruvat/Lactat, Hauptsubstrate der Glucosebildung. Daher kann der relativ

zu den Kontrollen beobachtete glucagoninduzierte Anstieg der Harnstoffsynthese als Maß für eine erhöhte Gluconeogenese aus Aminosäuren dienen. Die Werte für die glucagonstimulierte Harnstoffsynthese liegen im Falle der Hungerratten-Hepatozyten durchgehend höher als bei den Hepatozyten von gefütterter Ratte, vgl. Abb. 5 und 7. Gleichzeitig liegt jedoch die Relation zwischen glucagonstimulierter Harnstoffproduktion und glucagonstimulierter Glucoseproduktion, als Differenz zu den jeweiligen Kontrollwerten gemessen, vom 2. bis 4. Kulturtag bei den Hungerratten-Hepatozyten deutlich niedriger (1,1 - 1,3) als bei den Hepatozyten von gefütterter Ratte (1,9 - 2,1). Die glucagonstimulierte Zunahme der Glucosebilanz wird im ersten Fall mit einem relativ geringeren Umsatz von Aminosäuren erreicht. Diese Beobachtungen zeigen, daß bei Hungerratten-Hepatozyten in Anwesenheit von Glucagon einerseits eine gesteigerte Gluconeogenese aus Aminosäuren stattfindet, wie aus der höheren Harnstoffproduktion hervorgeht, daß gleichzeitig aber offenbar auch ein gegenüber den Hepatozyten von gefütterten Ratten verringerter Glucosemetabolismus stattfindet, worauf die geringere Relation Harnstoff:Glucose hinweist. In Anwesenheit von Insulin/Dexamethason vermag Glucagon die Hepatozyten von gefütterter Ratte also offensichtlich weniger zur Gluconeogenese zu stimulieren und gleichzeitig auch den Glucosemetabolismus (Glycolyse, Pentosephosphatzyklus, Fettsynthese) weniger zu inhibieren als im Falle der Hepatozyten vom Hungertier. Dies mag auf die Beibehaltung einer stark unterschiedlichen Enzymausstattung beruhen, etwa der Aktivität der für den Glucosemetabolismus in der Kultur limitierenden Glucokinase, deren Aktivität in frisch isolierten Hepatozyten vom gefütterten Tier höher liegt als in den Zellen vom gehungerten Tier und durch die hier angewandten Kulturbedingungen (Ins/Dex) auf hohem Niveau aufrechterhalten wird (127). In Anwesenheit höherer Glucosekonzentrationen im Inkubationsmedium führt die Aufrechterhaltung hoher Aktivitäten glucosemetabolisierender Enzyme zu der beobachteten deutlichen Verschiebung der glykogenkorrigierten Glucosebilanzen in Richtung Glucoseaufnahme (Tab. 4). Unter den hier angewandten Hormonbedingungen, d.h. bei durchgehender Anwesenheit

von Insulin/Dexamethason, kann die hohe Glucoseaufnahme auf eine erhöhte Glykolyse und/oder Fettsynthese zurückgeführt werden. Als Hinweis auf eine gesteigerte Lipidsynthese ist die bereits im lichtmikroskopischen Bild erkennbare Anhäufung von Fetttröpfchen zu werten.

4.2.2. Einfluß der Kultivierung unter verschiedenen Hormonbedingungen auf die Gluconeogenesekapazität

Die Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Hormonbedingungen auf den Gluconeogenese-Status der Hepatozyten während mehrtägiger Kultivierung zeigen, daß die Fähigkeit zur Gluconeogenese bei Zellen vom gefütterten und gehungerten Tier in entscheidender Weise von der Hormonvorbehandlung abhängt. Wie aus der drastischen Abnahme der Gluconeogenese unter stimulierenden Inkubationsbedingungen und dem gleichzeitig beobachteten Übergang der basalen Glucosebilanz von der Glucosebildung zu einer zunehmenden Netto-Glucoseaufnahme hervorgeht (Abb. 10, 11), kommt es unter Kontrollbedingungen, d.h. bei Kultivierung in serumhaltigem Medium ohne Hormonsupplemente, zu einem spontanen Verlust der Gluconeogenesekapazität und einer allgemeinen Veränderung der kultivierten Zellen in Richtung eines glucoseverbrauchenden, glykolytischen Zustandes. Insbesondere Hepatozyten von gefüttertem Tier zeigen dabei am 3. und 4. Tag unter basalen Inkubationsbedingungen die Tendenz, die niedrige Restglucose aus dem Serumanteil des Mediums weitgehend zu verbrauchen. Aufgrund der Tatsache, daß die unter basalen Inkubationsbedingungen beobachtete zunehmende Glucoseaufnahme in Anwesenheit sehr geringer externer Glucosekonzentrationen (< 0,3 mM) stattfindet, kommt der Hexokinase, die in vivo einen nur unbedeutenden Anteil zur Glucose-Phosphorylierung beiträgt, vermutlich eine vorrangige Rolle gegenüber der hepatozytenspezifischen Glucokinase zu, da diese aufgrund des hohen K_m-Wertes (ca. 10 mM (18)) und einer in Abwesen-

heit von Insulin und Dexamethason geringen Restaktivität in der Primärkultur (127,143) unter diesen Bedingungen einen nur geringen Beitrag zu leisten vermag. Nach Schudt (127) bleibt die Hexokinaseaktivität, im Gegensatz zur Glucokinase, in der Primärkultur während zweitägiger Kultivierung auf dem Ausgangswert erhalten, wird von verschiedenen Hormonbedingungen in nur unbedeutender Weise beeinflußt und beträgt nach 2 Tagen in Anwesenheit von Insulin und Dexamethason ca. 10 % der gesamten Glucose-phosphorylierenden in vivo-Aktivität (gemessen unter 0,5 mM (HK) bzw. 100 mM Glucose (GK)).

Der Verlust der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese ist nach Vorbehandlung mit Glucagon noch deutlicher ausgeprägt als nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen (siehe Tab. 7). Dies läßt auf einen desensibilisierenden Einfluß dieser Hormonbehandlung auf die glucagonstimulierte Gluconeogenese aus C3-Vorstufen (Pyr/Lac) schließen. Diese Beobachtung erscheint zunächst unerwartet, da Glucagon als ein Hormon bekannt ist (115), welches die Gluconeogenese an verschiedenen Stellen der Reaktionssequenz stimulierend zu beeinflussen vermag: Als kurzfristig wirksame Effekte wurden die Inaktivierung von Pyruvatkinase (13,34,40) und Phosphofructokinase (27,63) nachgewiesen, die im ersten Fall über die Phosphorylierung des Enzyms, im zweiten über einen verstärkten Abbau von Fructose-2,6-bisphosphat, des allosterischen Aktivators der Phosphofructokinase und gleichzeitigen allosterischen Hemmers der Fructose-1,6-Bisphosphatase, zustande kommt;aus der Inaktivierung dieser glykolytischen Enzyme, die jeweils Komponenten von operierenden "futile cycles" sind (69), resultiert eine Änderung des Substratflusses zugunsten der Gluconeogenese (27,40). Als längerfristige Glucagonwirkungen sind vor allem die Induktion des Schlüsselenzyms Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (90,112,130) sowie die Stimulation der respiratorischen Aktivität der Mitochondrien (58) bedeutsam.

Die Stimulation der Gluconeogenese durch kurzfristige, d.h. sofort eintretende, und längerfristige, nach einer lag-Phase

von 1 - 2 Stunden wirksam werdende Effekte von Glucagon konnte auch an serumfrei gehaltenen Hepatozyten in Primärkultur nachgewiesen werden (87,148). Diese Untersuchungen wurden allerdings nur an 2 Tage alten Kulturen vorgenommen, die nur kurze Zeit mit Glucagon vorbehandelt worden waren und zwischen 30 min und 2 h inkubiert wurden. Ein maximaler Hormoneffekt wurde nach 5-stündiger Vorbehandlung ermittelt; nach längerer Vorbehandlung nahm der stimulierende Einfluß ab, aber auch nach 15 Stunden war noch eine Stimulation zu beobachten (87).

Im Gegensatz zu dieser nach kurzer Vorbehandlung gefundenen Stimulierbarkeit weist die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Desensibilisierung bei langfristiger Kultivierung (Tage) unter hohen Glucagonkonzentrationen (10^{-6} oder 10^{-7} M) auf einen Defekt im Wirkungsgefüge der Glucagonstimulation hin. Dieser hier nicht näher untersuchte Verlust an Stimulierbarkeit könnte auf eine "Down-Regulation" der Glucagonrezeptoren oder einen post-Rezeptor-Defekt zurückzuführen sein. Eine Down-Regulation von Rezeptoren in Anwesenheit hoher Hormonkonzentrationen ist für eine Reihe von Hormonen bekannt (25) und wurde neben Peptidhormonen wie Insulin (75) und Wachstumshormon (96) auch für Steroide (104) und ß-adrenerge Katecholamine (107) nachgewiesen. Sie wird allgemein auf einen Verlust hormonassoziierter Rezeptormoleküle zurückgeführt, die in der Mehrzahl der Fälle über einen "coated-pit"-Mechanismus mittels endozytotischer Vesikel in die Zelle aufgenommen und lysosomal abgebaut werden (25). Eine solche hormonabhängige Regulation wurde für den Glucagonrezeptor in vivo gefunden (43) und konnte auch in vitro nachgewiesen werden (122): An frisch isolierten Hepatozyten in Kurzzeitkultur (Stunden) wurde bereits nach 6-stündiger Inkubation mit Glucagon eine deutliche Abnahme der Zahl der Rezeptoren (35 %) gefunden; dies konnte auf eine verstärkte Degradation der Bindungsstellen bei gleichzeitig unveränderter Affinität der verbleibenden Rezeptoren zurückgeführt werden und korrelierte mit einer verminderten cAMP-Bildung in Anwesenheit von Glucagon (122).

Untersuchungen über den Rezeptor-Status von langfristig unter Glucagon kultivierten Hepatozyten liegen bisher nicht vor, nach den hier ermittelten Ergebnissen zur glucagonstimulierten Gluconeogenese ist jedoch eine gegenüber unbehandelten Zellen verringerte Zahl von Rezeptoren oder entsprechende Veränderungen von post-Rezeptor-Vorgängen zu erwarten.

Im Gegensatz zu dem desensibilisierenden Effekt auf die stimulierte Gluconeogenese ist der Einfluß der Glucagonvorbehandlung auf die basale Glucosebilanz bei Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier während der gesamten Kultivierungszeit gegenüber den Kontrollen positiv (Abb. 10 und 11). Die Veränderung in Richtung auf einen glucoseverbrauchenden, glykolytischen Zustand ist unter Glucagon offenbar verlangsamt; dies kann auf eine geringere Aktivität der Glucokinase, deren Halbwertszeit in der Primärkultur durch Glucagon deutlich verringert wird (143), bei gleichzeitig erhöhter PEPCK-Aktivität (112,130) zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu dem nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon beobachteten drastischen Verlust der Gluconeogenesekapazität bewirkt die Kultivierung in Anwesenheit von Dexamethason eine deutliche Stabilisierung sowohl der basalen als auch der glucagonstimulierten Gluconeogenese. Unter basalen Inkubationsbedingungen wird hier bei Hepatozyten vom gefütterten und gehungerten Tier während der gesamten Kultivierungszeit eine positive Glucosebilanz, d.h. eine Netto-Glucosesynthese, gefunden, während unter stimulierenden Inkubationsbedingungen (Gluca + Pyr/Lac) am 4. Tag noch ca. 50 % der Ausgangswerte vom 1. Tag gemessen wurden.

Wie die Umsetzversuche (Kap. 3.2.4.) zeigen, vermag Dexamethason den Verlust der Gluconeogenesekapazität, der nach Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon zu beobachten ist, auch nach längerer Kultivierung unter diesen nicht-stabilisierenden Bedingungen rückgängig zu machen. Die Vorbehandlung mit Dexamethason ist offenbar eine Voraus-

setzung für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Antwort der Zellen auf die Stimulation durch Glucagon; Dex übt also eine permissive Wirkung aus. Die Tatsache, daß Glucocorticoide einen permissiven Effekt auf die Wirkung anderer Hormone ausüben, ist seit längerem bekannt und wurde ursprünglich im Zusammenhang mit cAMP-vermittelten Effekten auf Glykogenolyse, Gluconeogenese und Lipolyse erkannt (36); in allen Fällen lag der in Lebern von adrenalektomierten Tieren gefundene Defekt der Aktivierung durch Glucagon oder Adrenalin jenseits von cAMP-Produktion und Proteinkinaseaktivierung (37,120). In jüngerer Zeit wurden weitere Beispiele für die permissive Wirkung von Glucocorticoiden nachgewiesen, z.B. im Zusammenhang mit der Glucagonstimulation des Aminosäuretransports (84) und der Glucagon-Induktion von Harnstoffzyklusenzymen (45), der Induktion von Glykogensynthase (130) und Glucokinase (127) durch Insulin und der Stimulation der Gluconeogenese durch den α-adrenergen (cAMP-unabhängigen) Agonisten Phenylephrin (37). Nach Exton et al. (36,37) könnte der weitverbreitete permissive Einfluß der Glucocorticoide auf die Beibehaltung eines normalen intrazellulären Ionenmilieus, insbesondere von Ca^{2+}, zurückzuführen sein.

Die permissive Wirkung der Glucocorticoide auf die Gluconeogenese-Stimulation durch Glucagon scheint in erster Linie in einer erhöhten Transkription von mRNA der PEPCK zu liegen, die dann unter dem Einfluß von cAMP verstärkt translatiert wird (90,130). Nach den Ergebnissen von Kletzien et al. (87) scheinen Glucocorticoide auch einen direkten stimulierenden Effekt auf die Gluconeogenese auszuüben, indem sie die glykolytischen Enzyme Pyruvatkinase und Phosphofructokinase inhibieren.

Der Verlust der Stimulierbarkeit durch Glucagon, den die Zellen bei der Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon zeigen, läßt auf einen Übergang der Zellen in einen Zustand schließen, der dem in der Leber adrenalektomierter Tiere ähnelt: Wie bei diesen, kann der Defekt in der Hormonantwort durch Behandlung mit Dexamethason rückgängig

gemacht werden; hierzu sind in der Kultur etwa 2 Tage nötig. Während mehrtägiger Kultivierung unter Dexamethason/Glucagon zeigte sich allgemein ein ausgeprägter biphasischer Verlauf der Fähigkeit zur stimulierten Gluconeogenese, mit einer gegenüber Dex-vorbehandelten Zellen stärkeren initialen Abnahme, einem Minimalwert am 3. Tag und einem bei verschiedenen Kulturen unterschiedlich stark ausgeprägten Wiederanstieg der Gluconeogenesekapazität, wobei am 4. Tag allgemein höhere Werte als bei Dex-behandelten Zellen gefunden wurden (Abb. 11 und Tab. 7). Dieser Verlauf läßt darauf schließen, daß der desensibilisierende Einfluß des Glucagons auf die glucagonstimulierte Gluconeogenese auch in Anwesenheit von Dexamethason wirksam ist und in der Anfangsphase gegenüber der permissiven Wirkung des Dexamethasons überwiegt, während es in der Folge zu einer Verschiebung der Hormoneffekte zugunsten des permissiven Einflusses kommt, so daß der gluconeogenetische Status der Hepatozyten bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glucagon und Dexamethason über den der Dex-vorbehandelten Zellen angehoben wird. Der anfänglich überwiegende desensibilisierende Einfluß des Glucagons ist auch aus dem Verlauf der Gluconeogenesekapazität von Zellen zu erkennen, die nach Dex-Vorbehandlung auf Dex/Gluca-haltiges Medium (Dex/Gluca, Dex/Gluca/Ins) umgesetzt wurden (Abb. 14 und 15).

Die Vorbehandlung mit Insulin in Anwesenheit von Dexamethason (Ins/Dex, Ins/Dex/Gluca) hat nur einen geringen senkenden Einfluß auf die stimulierte Gluconeogenese, jedoch einen deutlichen Effekt auf die basale Glucosebilanz, verglichen mit den Kontrollen (Dex, Abb. 8 und 9). Die verstärkte Glucoseaufnahme ist vermutlich auf die unter Ins/Dex stark erhöhte Aktivität der Glucokinase in den kultivierten Zellen zurückzuführen (127).

Im Rahmen der Umsetzversuche von nicht-stabilisierenden (K, Gluca) auf stabilisierende Hormonbedingungen (Dex, Dex/Gluca, Ins/Dex/Gluca) erwies sich der Wechsel am 2. Tag, d.h. nach ca. 28 Stunden, als besonders günstig im Hinblick auf die Wiedergewinnung einer hohen Gluconeogenesekapazität der kul-

tivierten Hepatozyten: Am 4. Tag wurden hier teilweise deutlich höhere Gluconeogenesewerte ermittelt als nach durchgehender Kultivierung unter den stabilisierenden Bedingungen (Abb. 13-15). Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis muß vor dem Hintergrund einer unter diesen Bedingungen möglichen Selektion von Hepatozyten gesehen werden. Bei durchgehender Kultivierung unter Kontrollbedingungen und Glucagon nimmt die Zellzahl (gemessen als Proteingehalt pro Kulturschale) deutlich ab: Nach 4 Tagen werden ca. 50 % der Werte zum Zeitpunkt des ersten Medienwechsels (5 Stunden) gemessen, wobei der größte Teil des Zellverlustes (ca. 30 %) während des 1. Kulturtages beobachtet wird; bei durchgehender Kultivierung unter Dexamethason oder Dexamethason/Glucagon nimmt der Proteingehalt während 4-tägiger Kultivierung um maximal ca. 20 % ab, während er in Anwesenheit von Ins/Dex oder Ins/Dex/Gluca weitgehend konstant bleibt. In Abwesenheit von Dexamethason und Insulin - die geringen Mengen an Ins und Glucocorticoid aus dem Serumanteil des Mediums werden in der Anfangsphase der Kultur besonders schnell abgebaut (12) - vermag sich offenbar ein Teil der Hepatozyten nicht an die in vitro-Bedingungen zu adaptieren. Dies führt vermutlich zu einer relativen Anreicherung besonders funktionstüchtiger Zellen unter diesen anspruchsvolleren Bedingungen, verglichen mit den fördernden Bedingungen unter Insulin und Dexamethason, wo auch weniger vitale, während der Isolierungsprozedur beeinträchtigte Zellen zu überleben vermögen. Nach dem Umsetzen von Kontrollbedingungen oder Glucagon auf Dex-haltige Medien (Dex, Dex/Gluca, Ins/Dex/Gluca) bleibt die zum Zeitpunkt des Wechsels vorhandene Zellzahl während der folgenden Kultivierungszeit weitgehend konstant, so daß sich der permissive Effekt auf eine zunehmend von weniger vitalen Zellen befreite Hepatozytenpopulation auswirken kann.

Die Interpretation, daß die nach dem Umsetzen von Kontroll- und Glucagon-Vorbehandlung auf Dexamethason-Behandlung beobachteten vergleichsweise hohen Gluconeogenesewerte auf einer relativen Anreicherung besonders funktionstüchtiger

Zellen beruhen, wird durch die Beobachtung bestärkt, daß nach dem Wechsel vor allem dann deutlich höhere Werte als bei durchgehend unter stabilisierenden Hormonbedingungen kultivierten Zellen gefunden wurden, wenn die Werte bei diesen von Kulturbeginn an ungewöhnlich niedrig lagen oder bis zum 4. Tag eine ausgeprägte Abnahme zeigten, während die Differenzen zu den Dex-behandelten Vergleichszellen nur gering waren, wenn diese durchgehend eine besonders hohe Gluconeogenesekapazität zeigten.

Diese Beobachtungen zeigen die Möglichkeit auf, durch sequenzielle Behandlung (Gluca, dann Dex, Dex/Gluca oder Ins/Gluca/Dex) in Kulturen mit unterschiedlicher initialer Gluconeogenesekapazität eine Hepatozytenpopulation mit hoher Kapazität aufrechtzuerhalten bzw. anzureichern, so daß am 4. Tag, unabhängig von Ausgangswert am 1. Tag, sehr ähnliche, hohe Gluconeogenesewerte gefunden werden, während demgegenüber die initialen Differenzen zwischen verschiedenen Kulturen bei durchgehender Kultivierung unter stabilisierenden Bedingungen (Dex, Dex/Gluca, Ins/Dex/Gluca) weitgehend erhalten bleiben (Tab. 7).

4.3. Glucose-6-Phosphatase

4.3.1. Biochemische Messungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein entscheidender Einfluß der Medienzusammensetzung auf die hormonelle Beeinflußbarkeit der G6Pase-Aktivität kultivierter Hepatozyten von gefütterter Ratte gefunden: Während die Aktivität in serumhaltigem L-15(mod.)-Medium in Anwesenheit von Dexamethason/T3/Glucagon (DTG) während der gesamten Kulturdauer auf hohem Niveau aufrechterhalten wird, haben dieselben Hormonbedingungen in W/AB-77-Medium einen nur marginalen Effekt, so daß es unter diesen Bedingungen, ähnlich wie in

W/AB-77 ohne Hormonsupplemente oder bei anderen Hormonkombinationen, zu einer drastischen Abnahme der G6Pase-Aktivität kommt, die noch ausgeprägter ist als in L15 ohne Hormonsupplemente. Beim Versuch, die Faktoren zu identifizieren, welche für die unterschiedliche Wirkung der beiden Medien auf die Enzymaktivität verantwortlich sind, wurde festgestellt, daß diese Wirkung offenbar auf einem komplexen Zusammenwirken mehrerer Faktoren beruht: einerseits sind in W/AB-77 Komponenten enthalten, die beim Supplementieren zu L15/DTG eine verstärkte Abnahme der G6Pase-Aktivität bewirken, andererseits kann in W/AB-77 durch gleichzeitiges Supplementieren mehrerer L15-typischer Komponenten bzw. -Konzentrationen eine Stabilisierung gegenüber nicht-supplementiertem Medium erreicht werden, jedoch nur in Anwesenheit von Dex/T3/Gluca. Dies deutet auf eine permissive Rolle der komplexen Medienzusammensetzung auf die Hormonwirkung hin: supplementierte Komponenten, die in W/AB-77 ohne Hormone keinen stabilisierenden Einfluß zeigen, sind Voraussetzung für die stabilisierende bzw. stimulierende Wirkung von Dex/T3/Gluca auf die G6Pase-Aktivität.

Der stabilisierende Einfluß, den die zusätzlichen Substrate in W/AB-77/DTG auf die G6Pase-Aktivität ausüben, ist zwischen verschiedenen Kulturen recht verschieden (Tab. 9). Aufgrund des komplexen, nicht auf einzelne Komponenten zurückführbaren Einflusses der Supplemente mag diese Beobachtung nicht überraschen: Da die Wirkung vermutlich über allgemeine Veränderungen des intrazellulären Milieus zustande kommt, welche sich auch in einer deutlich veränderten Morphologie der Zellen äußert (siehe Kap. 3.3.1.4.), können Einflüsse, wie Zelldichte, d.h. das Ausmaß der Zell-Zell-Wechselwirkungen, und der Status der Zellen im Hinblick auf die initiale Enzymausstattung, die Zahl und Intaktheit von Hormonrezeptoren und Transportsystemen für die verschiedenen Medienkomponenten eine zusätzliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der G6Pase-Aktivität spielen. Von Neupert (109) wurde an Primärkulturen von Hühner-Hepatozyten ein stabilisierender Einfluß hoher Zelldichte sowie der O_2- und Substratversorgung auf die G6Pase gefunden.

Da bei der verwendeten Methode zur Veränderung der Medienzusammensetzung, der Supplementierung vorgefertigter Basalmedien, keine identische Medienzusammensetzung erreicht werden kann, mag es nicht überraschen, daß durch gleichzeitiges Supplementieren von L15/DTG und W/AB-77/DTG keine völlige Annäherung der G6Pase-Aktivität erreicht wurde. Die lichtmikroskopischen Beobachtungen, aus denen hervorging, daß es mit zunehmender Supplementierung von W/AB-77/DTG mit L15-typischen Medienkomponenten zuerst zu einer Annäherung an die Morphologie von unter L15/DTG kultivierten Zellen kommt, danach jedoch, trotz eines weiteren Anstiegs der biochemisch meßbaren G6Pase-Aktivität, zu einer wieder abweichenden Morphologie, weisen darauf hin, daß es hierbei, etwa aufgrund veränderter Relationen zwischen einzelnen Medienkomponenten, zu einem von L15/DTG-Bedingungen abweichenden intrazellulären Milieu kommt.

Umsetzversuche bestätigten den unterschiedlichen Einfluß der beiden Medien: Nach dem Umsetzen von L15/DTG auf W/AB-77/DTG wurde eine starke Abnahme, nach dem Umsetzen von W/AB-77 auf L15/DTG eine deutliche Zunahme der Enzymaktivität beobachtet; hieraus ergibt sich, daß die unterschiedliche Wirkung nicht alleine auf einer Hemmung der Degradation beruhen kann, sondern eine unterschiedliche hormonelle Stimulierbarkeit einschließt.

Bei dem nach dem Umsetzen beobachteten Aktivitätsanstieg könnte es sich neben einer Zunahme aufgrund einer Synthese von Enzymprotein prinzipiell auch um eine Aktivierung vorhandenen Enzyms oder um die Verminderung einer zuvor gegebenen Latenz des membrangebundenen Enzyms handeln. Die Möglichkeit einer Aktivierung der G6Pase in vivo kann aufgrund der in vitro an Mikrosomenpräparationen gefundenen Stimulation durch cAMP-unabhängige Phosphorylierung (5) nicht mehr ausgeschlossen werden. Die Möglichkeit einer Beeinflussung der Latenz des Enzyms ist von in vivo-Untersuchungen bekannt: Glucocorticoid-Behandlung vermindert die Latenz, Fasten und Alloxan-Diabetes verstärken sie (3); diese Erscheinung läßt sich nach dem Substrat-Transport-Modell (siehe

Kap. 1.5.1.) mit einer Verschiebung in der Relation zwischen Transport- und katalytischer Komponente erklären. Eine Entscheidung darüber, welche der zuvor genannten Mechanismen zum Wiederanstieg der G6Pase-Aktivität nach dem Umsetzen von W/AB-77 auf L15/DTG führt und ob eine Desaktivierung oder Erhöhung der Latenz an der drastischen Abnahme der Enzymaktivität unter nicht-stabilisierenden Medien- und Hormonbedingungen beteiligt sind, könnte nur durch Quantifizierung der G6Pase mittels Antikörpern bzw. durch Bestimmung des latenten Anteils an isolierten Mikrosomenpräparationen getroffen werden; in diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß es erst in jüngster Zeit gelang, ein spezifisches Antiserum gegen die Leber-G6Pase zu gewinnen (22). Aus dem Zeitverlauf des Wiederanstiegs nach dem Umsetzen und dem Ausmaß des Aktivitätsverlustes erscheint eine vorrangige Regulation über Enzymsynthese bzw. -degradation wahrscheinlich.

Der Abbau der G6Pase findet vermutlich in den Lysosomen statt. Von Wanson et al. (155) wurde eine ab dem 2. Tag zunehmende Bildung von Cytolysomen beschrieben, in denen G6Pase zytochemisch nachweisbar war; hierbei handelte es sich offenbar um Reste degradierten ER's. Diese Befunde deuten darauf hin, daß Autophagosomen die Grundlage für die auch von diesen Autoren während mehrtägiger Kultivierung beobachtete starke Abnahme der G6Pase-Aktivität bilden. Von Untersuchungen an isolierten Hepatozyten ist bekannt, daß die lysosomale Degradation zelleigener Proteine mit längerer Halbwertszeit durch höhere Konzentrationen von Aminosäuren wie Leucin, Asparagin und Glutamin deutlich gehemmt werden kann (137). Andererseits ist bekannt, daß die lysosomale Proteindegradation in Hepatozyten-Monolayern durch Glucagon (65) und Dexamethason (66) stimuliert und durch Insulin (65) inhibiert wird. Der unterschiedliche Einfluß von L15(mod.) bzw. W/AB-77 auf den Verlauf der G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten kann nicht auf den inhibierenden Einfluß der höheren Aminosäurekonzentrationen in L15 zurückgeführt werden, da deren Supplementierung in Abwesenheit von Dex/T3/Gluca keine signifikante Verminde-

rung der starken Abnahme der Enzymaktivität in W/AB-77 bewirkt (s. Tab. 9). Andererseits könnte der fehlende stimulierende Effekt der in vivo aktivierenden Hormone Dexamethason und Glucagon sowie der auf niedrigem Aktivitätsniveau stabilisierende Einfluß von Insulin auf den jeweiligen stimulierenden bzw. inhibierenden Effekt auf die in W/AB-77 offensichtlich mit hoher Rate ablaufende Autophagolyse zurückzuführen sein.

In beiden Medien (L15(mod.), W/AB-77(suppl.)) wurde in Anwesenheit stabilisierender Hormonbedingungen (Dex/T3/Gluca) ein positiver Einfluß höherer Glucosekonzentrationen (5,5; 11 mM) auf die G6Pase-Aktivität der kultivierten Hepatozyten, verglichen mit glucosearm (0,3 mM) kultivierten Zellen gefunden (Tab. 12, 13). Die Kultivierung in Anwesenheit geringer extrazellulärer Glucose ist per se offensichtlich kein Stimulus für die Beibehaltung einer höheren Aktivität dieses glucogenen, für die Glucohomöostase in vivo wichtigen Enzyms. Andererseits wirkt die längerfristige Anwesenheit einer hohen Glucosekonzentration (11 mM) nicht unterdrückend, sondern im Gegenteil stabilisierend. Dieser stabilisierende Einfluß hoher Glucose auf die G6Pase könnte auf einer ähnlichen allgemeinen Wirkung auf das intrazelluläre Milieu der Zellen beruhen wie im Falle des Einflusses der L15-typischen Supplemente, da auch hier in Abwesenheit stabilisierender Hormone ein nur geringer (L15) oder insignifikanter(W/AB-77) Effekt der Glucosekonzentration gefunden wurde.

Systematische Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Basalmedien auf die metabolische Aktivität und Enzymausstattung kultivierter Hepatozyten fehlen in der überwiegenden Zahl der untersuchten Funktionen; im allgemeinen werden nur vergleichsweise geringe Differenzen zwischen unterschiedlich kultivierten Zellen gefunden.

Als Beispiel für einen quantitativ unterschiedlichen Einfluß verschiedener Medien können Ergebnisse von Gebhardt an unter Perifusion (46) für längere Zeit (bis 8 Tage) in Primärkultur

gehaltenen Hepatozyten dienen (46,47): Im Falle von Harnstoffzyklusenzymen, Glutaminsynthetase und TAT wurde ein deutlicher stabilisierender Einfluß von W/AB-77- gegenüber L15-Medium gefunden; für die Arginase konnte hierbei gleichzeitig eine in W/AB-77 für einen längeren Zeitraum aufrechterhaltene höhere Stimulierbarkeit durch Glucagon nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu blieb der Enzymspiegel der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in L15-Medium auf einem gegenüber W/AB-77 leicht erhöhten Niveau erhalten. In diskontinuierlich kultivierten Zellen waren die Differenzen zwischen den beiden Medien allgemein deutlich geringer ausgeprägt oder fehlten (46).

Als Beispiel für einen entscheidenden Einfluß des verwendeten Mediums auf die hormonelle Regulation eines Enzyms sei die ODC-Induktion durch Insulin erwähnt, bei welcher, ähnlich wie hier im Falle von W/AB-77 bzw. L15, ein ausgeprägter qualitativer Unterschied in der Induzierbarkeit und der Aufrechterhaltung induzierter Enzymspiegel zwischen Swim's S-77 und einem substrat-, insbesondere aminosäurereicheren modifizierten Waymouth's Medium (HI-WO/BA) beobachtet wurde (114). Da es sich bei der ODC um ein Enzym mit sehr kurzer Halbwertszeit handelt, könnte der Medienabhängigkeit der Hormonwirkung ein anderer Mechanismus zugrunde liegen als im Falle der Beeinflussung der G6Pase-Aktivität; gemeinsam zeigen diese beiden Beispiele jedoch die große Bedeutung der Wahl jeweils angepaßter Medienbedingungen für die Untersuchungen leberspezifischer Funktionen an kultivierten Hepatozyten.

4.3.2. Zytochemische Lokalisierung

Zytochemische Untersuchungen zur G6Pase-Verteilung zwischen den einzelnen Zellen der Monolayer nicht-proliferierender Hepatozyten in Primärkultur lagen bisher nicht vor. Im Hinblick auf die intrazelluläre Lokalisierung der G6Pase konn-

ten Wanson et al. (155) mittels elektronenmikroskopsicher Zytochemie zeigen, daß die Reaktionsprodukte innerhalb der Zellen kontinuierlich längs des rERs, sERs und der Kernmembran verteilt sind, und daß sich diese Verteilung während 3-tägiger Kultivierung, bei allgemeiner Abnahme der Intensität der zytochemischen Reaktion, nicht ändert.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur zytochemischen Lokalisierung der G6Pase innerhalb der Monolayer zeigten die Möglichkeit der Aufrechterhaltung einer distinkten Heterogenität der Aktivität zwischen den einzelnen Zellen der Layer, wenn die Zellen unter Medienbedingungen kultiviert wurden, unter welchen sie die G6Pase-Aktivität weitgehend zu stabilisieren vermögen; unter nicht-stabilisierenden Medienbedingungen nahm demgegenüber die Gesamtintensität der zytochemischen Reaktion und die Zahl intensiver reagierender Hepatozyten im Laufe der Kultivierung stark ab, so daß hier eine Heterogenität allgemein nur bis zum 3. Tag feststellbar war.

Die in vivo (73), an Kryostatschnitten frisch isolierten Hepatozyten (123) und im Rahmen dieser Arbeit am Beginn der Kultur (Bild 1) zwischen den einzelnen Zellen nachgewiesene Heterogenität der G6Pase-Aktivität kann auf die unterschiedliche Mikroumgebung der Hepatozyten in vivo zurückgeführt werden, die durch unterschiedliche O_2-, Substrat- und Hormonkonzentrationen sowie durch unterschiedliche autonome Innervation und Nachbarschaft zu Nichtparenchymzellen charakterisiert ist. In der Primärkultur sollten diese phänotypischen Differenzen, die die Grundlage der "metabolischen Zonierung" des Leberazinus in vivo bilden (73), unter für alle Zellen der Monolayer identischen Medienbedingungen nach einiger Zeit verschwinden. Für die PEPCK, ein weiteres Schlüsselenzym der Gluconeogenese, wurde eine solche Nivellierung der Enzymaktivität beschrieben (1); diese lies sich sowohl auf niedrigem Aktivitätsniveau (in Anwesenheit von Insulin) als auch auf hohem Niveau (unter Glucagon) nachweisen. Im Gegensatz hierzu wurde im Falle der Glutaminsynthetase, die in vivo eine besonders ausgeprägte heterogene Verteilung zeigt, mit einer praktisch aus-

schließlichen Lokalisierung in einer nur wenige Zellbreiten umfassenden Zone im perivenösen Bereich des Leberazinus, eine unter verschiedenen Medienbedingungen für mindestens 3 Tage aufrechterhaltene "Alles-oder-Nichts"-Heterogenität der Enzymverteilung zwischen den einzelnen Hepatozyten der Monolayer gefunden (48).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Abhängigkeit der Aufrechterhaltung einer distinkten Heterogenität von den Medienbedingungen stellt eine Situation zwischen den beiden zuvor beschriebenen Beispielen dar: Unter nicht-stabilisierenden Bedingungen (W/AB-77 ± Hormone; L15 ohne Hormone) kommt es hier im Laufe von ca. 3 Tagen zum Ausgleich der ursprünglich vorhandenen Heterogenität auf einem niedrigen Intensitätsniveau, auf dem kleinere noch vorhandene Differenzen nicht mehr wahrnehmbar wären; der im Vergleich zur PEPCK deutlich verlängerte Zeitraum kann auf die längere Halbwertszeit der G6Pase zurückgeführt werden (PEPCK: 5 h (64); G6Pase: ca. 1 - 1,5 Tage, siehe Abb. 16).

Unter stimulierenden bzw. stabilisierenden Bedingungen (L15/DTG; W/AB-77(suppl.)/DTG) kommt es demgegenüber zur Aufrechterhaltung der Heterogenität, d.h. zur Beibehaltung eines beträchtlichen Anteils intensiver gefärbter Hepatozyten neben Zellen mit deutlich geringerer zytochemischer G6Pase-Reaktion; hierbei handelt es sich vermutlich um Hepatozyten, die bereits in vivo mit unterschiedlicher Aktivität ausgestattet waren und diese unter den stabilisierenden Medienbedingungen aufrechtzuerhalten vermögen.

Die lichtmikroskopische Beobachtung einer sehr unterschiedlichen Morphologie der Hepatozyten unter stabilisierenden bzw. nicht-stabilisierenden Bedingungen (s. Kap. 3.3.1.4.) und die unter stabilisierenden Medienbedingungen in Bereichen höherer Zelldichte und starker Gallencanaliculi-Bildung gefundene besonders ausgeprägte zytochemische Reaktion deuten auf einen Einfluß von Zell-Zell-Wechselwirkungen auf die Beibehaltung der G6Pase-Aktivität hin; solche in verschiedenen Bereichen der Monolayer unterschiedlich stark

ausgeprägten Wechselwirkungen könnten Ausdruck einer trotz identischer Medienbedingungen unterschiedlichen Mikroumgebung der Hepatozyten sein und damit eine "mikro-metabolische Zonierung" in vitro darstellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Glykogen

In frisch isolierten Hepatozyten von gefütterter Ratte wurde ein Glykogengehalt von ca. 150 µg/mg Protein ermittelt, während in Hepatozyten vom gehungerten Tier kein Glykogen nachweisbar war.
Nach einer ausgeprägten glykogenolytischen Anfangsphase (ca. 1 Tag) vermochten die Zellen im weiteren Verlauf hohe Glykogenspiegel zu resynthetisieren, wenn sie in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen und Insulin kultiviert wurden.
Die glykogene Wirkung von Insulin ist von der permissiven Wirkung von Glucocorticoiden (Dexamethason) abhängig.
Die große Bedeutung eines gluconeogenetischen Substratflusses für die Aufrechterhaltung und Wiedergewinnung hoher Glykogenspiegel auch unter physiologischen extrazellulären Glucosekonzentrationen konnte gezeigt werden.

Harnstoffsynthese

Die Fähigkeit der kultivierten Hepatozyten zur Harnstoffsynthese aus den Aminosäuren des Kulturmediums wird unter verschiedenen Hormonbedingungen (± Glucagon ± Dexamethason) während der gesamten Kultivierungszeit auf hohem Niveau aufrechterhalten.
Die Harnstoffproduktion unter Inkubationsbedingungen ist durch Glucagon, mit der Kulturdauer zunehmend, stimulierbar und wird durch die Anwesenheit von Glucose und Pyruvat/Lactat vermindert.
Hepatozyten von gehungerter Ratte, die in Abwesenheit von Hormonsupplementen oder unter Glucagon kultiviert wurden, zeigen unter Inkubationsbedingungen (Glucagon + Pyruvat/Lactat) eine mit der Kulturdauer zunehmende bevorzugte Metabolisierung von Aminosäuren gegenüber Pyruvat/Lactat. Dieser aminosäure-katabole Zustand kann durch Dexamethason-Behandlung rückgängig gemacht werden.

Gluconeogenese

Die Gluconeogenesekapazität kultivierter Hepatozyten von gefütterter und gehungerter Ratte wird während mehrtägiger Kultur in entscheidender Weise durch die Hormonvorbehandlung beeinflußt:

- Unter Normalbedingungen, d.h. in serumhaltigem W/AB-77-Medium ohne Hormonsupplemente, geht die Fähigkeit zur Gluconeogenese unter stimulierenden Bedingungen (Glucagon + Pyruvat/Lactat) weitgehend verloren; am 4. Tag werden hier ca. 20 % der Werte vom 1. Tag gemessen. Unter basalen Inkubationsbedingungen zeigen diese Zellen einen mit der Kulturdauer zunehmenden Übergang in einen glucoseverbrauchenden, glykolytischen Zustand.
- Die Vorbehandlung mit Glucagon führt zu einer Desensibilisierung der Hepatozyten gegenüber der Stimulation durch Glucagon - am 4. Tag werden hier nur noch ca. 10 % der Werte vom ersten Tag gefunden - und vermag den Übergang in einen glucoseverbrauchenden Zustand gegenüber den Kontrollbedingungen nur zu verzögern.
- Die Vorbehandlung mit Insulin wirkt sich vor allem auf die basale Glucosebilanz aus, welche deutlich zur Glucoseaufnahme hin verschoben wird, während die stimulierte Gluconeogenese nur wenig vermindert wird.
- Nach Vorbehandlung mit Dexamethason bleibt die Kapazität zur stimulierten Gluconeogenese mit am 4. Tag ca. 50 % der Ausgangsaktivität auf einem relativ hohen Niveau erhalten; unter basalen Inkubationsbedingungen wird hier, im Gegensatz zu den Vorbehandlungen ohne Dexamethason, während der gesamten Kultivierungszeit eine positive Glucosebilanz gefunden.
- Nach Vorbehandlung mit Dexamethason/Glucagon wurde ein typischer biphasischer Verlauf der Gluconeogenesekapazität unter stimulierenden Bedingungen beobachtet, mit einer zu Beginn der Kultur gegenüber Dexamethason-Vorbehandlung ausgeprägteren Abnahme und einem Wiederanstieg der Kapazität über die entsprechenden Werte nach durchgehender Dex-Kultivierung hinaus.

- Umsetzversuche, d.h. sequentielle Vorbehandlungen unter verschiedenen Hormonbedingungen, zeigten, daß die Vorbehandlung mit Dexamethason einen längere Zeit nachwirkenden stabilisierenden Einfluß auf den gluconeogenetischen Status ausübt, und daß andererseits von nicht-stabilisierenden Bedingungen (Kontrolle, Gluca) auf stabilisierende Bedingungen (Dex, Dex/Gluca, Dex/Gluca/Ins) umgesetzte Zellen nach 1 - 2tägiger Behandlung mit Dexamethason eine hohe Gluconeogenesekapazität wiedererlangen.
  Diese Ergebnisse zeigten einen permissiven Einfluß von Glucocorticoid auf die Beibehaltung der Fähigkeit zur Gluconeogenese.

Glucose-6-Phosphatase

Biochemische Messungen

Der Verlauf der G6Pase-Aktivität der Hepatozyten zeigte während 4-tägiger Kultivierung eine ungewöhnlich starke Abhängigkeit von den verwendeten Basalmedien: In W/AB-77-Medium geht die Aktivität nach 4 Tagen auf ca. 15 % der Ausgangswerte zurück, wobei der Verlauf durch sehr verschiedene Hormonsupplemente nur wenig zu beeinflussen ist; gleichzeitig bleibt die unspezifische Phosphatase weitgehend unverändert.

In L15(mod.)-Medium wird demgegenüber eine deutlich geringere Abnahme der G6Pase-Aktivität gefunden, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Hormonsupplementen; als besonders effektiv im Hinblick auf die Stabilisierung einer hohen G6Pase-Aktivität erwies sich hierbei die Hormonkombination Dexamethason/T3/Glucagon, in deren Anwesenheit die Aktivität zwischen dem 2. und 4. Tag auf einem Niveau von 70 - 80 % der Ausgangswerte aufrechterhalten wird. Dieselbe Hormonkombination hat in W/AB-77-Medium einen nur unbedeutenden stabilisierenden Einfluß.
Versuche, mittels Supplementieren von W/AB-77 bzw. L15 die entscheidenden Faktoren zu identifizieren, die für die unterschiedliche Hormonwirkung in beiden Medien verantwortlich sind, zeigten, daß keiner einzelnen Medienkomponente eine

vorrangige Bedeutung zugeordnet werden kann, daß es vielmehr eines komplexen Zusammenwirkens mehrerer Komponenten bedarf, um den Hormoneffekt auf die G6Pase-Aktivität wirksam werden zu lassen, während diese Komponenten alleine eine nur geringe Wirkung zeigen. Dies bedeutet, daß die Medienzusammensetzung einen permissiven Einfluß auf die hormonelle Regulation der G6Pase ausübt, ein Effekt, der in diesem Ausmaß bei anderen Enzymen nicht festgestellt wurde.

Umsetzversuche zwischen W/AB-77- und L15-Medium bestätigten den unterschiedlichen Einfluß der beiden Medien und zeigten, daß es sich hierbei zumindest teilweise um eine unterschiedliche hormonelle Stimulierbarkeit der G6Pase-Aktivität handelt. Lichtmikroskopische Beobachtungen zeigten eine in beiden Medien in charakteristischer Weise unterschiedliche Morphologie von Zellen und Monolayer und weisen auf ein unterschiedliches intrazelluläres Milieu hin; im Rahmen der Veränderung der Medienzusammensetzung des W/AB-77-Mediums wurde eine partielle Annäherung an die Morphologie von unter L15 kultivierten Hepatozyten beobachtet.
In L15 und W/AB-77 wurde ein positiver Einfluß hoher Glucosekonzentration (11 mM) gegenüber glucosearmer Kultivierung (0,3 mM) gefunden; der Einfluß war jedoch nur unter Bedingungen signifikant, unter denen die Hepatozyten eine hohe G6Pase-Aktivität aufrechtzuerhalten vermögen.

Zytochemische Lokalisierung

Zytochemische Untersuchungen über die Verteilung der G6Pase zwischen den einzelnen Zellen der Hepatozyten-Monolayer zeigten einen von den Medienbedingungen abhängigen unterschiedlichen Verlauf von Intensität der zytochemischen Reaktion und Ausmaß der heterogenen Verteilung:
Unter nicht-stabilisierenden Kulturbedingungen nahm die Intensität der Reaktion stark ab, in Übereinstimmung mit den biochemischen Messungen der G6Pase-Aktivität; gleichzeitig ging das Ausmaß der in den isolierten Zellen zu Beginn der Kultivierung beobachteten Heterogenität deutlich zurück und

war unter diesen Bedingungen nur bis zum 3. Tag festzustellen, während am 4. Tag eine homogene, schwache zytochemische Reaktion gefunden wurde.
Demgegenüber wurde unter G6Pase-stabilisierenden Kulturbedingungen (L15/DTG; W/AB-77(suppl.)/DTG) auch nach 4 Tagen in der Kultur eine distinkte Heterogenität mit einem hohen Anteil an Hepatozyten mit intensiver zytochemischer Reaktion beobachtet.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Andersen, B., Nath, A. & Jungermann, K. (1982) Eur. J. Cell Biol. 28, 47-53

2. Arion, W.J., Wallin, B.K., Lange, A.J. & Ballas, L.M. (1975) Mol. Cell. Biochem. 6, 75-83

3. Arion, W.J., Lange, A.J. & Ballas, L.M. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6784-6790

4. Ashmore, J. & Weber, G. (1959) Vitam. Horm. (N.Y.) 17, 91-132

5. Begley, P.J. & Craft, J.A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1029-1034

6. Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1257-1259

7. Bernaert, D., Wanson, J.-C., Drochmans, D. & Popowski, A. (1977) J. Cell Biol. 74, 878-900

8. Bernaert, D., Penasse, W. & Wanson, J.-C. (1979) Arch. Internat. Physiol. Biochim. 87, 777-778

9. Berry, M.N. & Friend, D.S. (1969) J. Cell Biol. 43, 506-520

10. Bissell, D.M., Hammaker, L.E. & Meyer, U.A. (1973) J. Cell Biol. 59, 722-734

11. Bissell, D.M. & Guzelian, P.S. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 349, 85-98

12. Blackard, W. G., Guzelian, P.S. & Small, M.E. (1978) Endocrinol. 103, 548-553

13. Blair, J.B., Cimbala, M.A., Foster, J.L. & Morgan, R.A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3756-3762

14. Bloxham, D.P., Fitzsimmons, J.T.R. & York, D.A. (1977) Horm. Metab. Res. 9, 253-346

15. Bollen, M., Doperé, F. & Stalmans, W. (1981) Arch. Internat. Physiol. Biochim. 89, B149-B150

16. Bonney, R.J., Becker, J.E., Walker, P.R. & Potter, V.R. (1974) In Vitro 9, 399-413

17. Bonney, R.J. (1974) In Vitro 10, 130-142

18. Bontemps, F., Hue, L. & Hers, H.G. (1978) Biochem. J. 174, 603-611

19. Bot, G., Andrássy, K.O. & Kovács, E.F. (1960) A. Physiol. Acad. Sci. Hung. 17, 377-381

20. Bot, G. & Vereb, G. (1966) A. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 1, 169-177

21. Brinkmann, A., Katz, N., Sasse, D. & Jungermann, K. (1978) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1561-1571

22. Burchell, A. & Burchell, B. (1982) Biochem. J. 205, 567-573

23. Cahill, G.F., Ashmore, J., Renold, A.E. & Hastings, A.B. (1959) Am. J. Med. 26, 264-282

24. Cahill, G.F. (1970) N. Engl. J. Med. 282, 668-675

25. Catt, K.J., Harwood, J.P., Aguilera, G. & Dufau, M.L. (1979) Nature 280, 109-116

26. Chapman, G.S., Jones, A.L., Meyer, U.A. & Bissell, D.M. (1973) J. Cell Biol. 59, 735-747

27. Clark, M.G., Kneer, N.M., Bosch, A.L. & Lardy, H.A. (1974) J. Biol. Chem. 249, 5695-5703

28. Clark, D.G., Rognstad, R. & Katz, J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2028-2036

29. Crane, L.J. & Miller, D.L. (1977) J. Cell Biol. 72, 11-25

30. Dallner, G., Siekevitz, P. & Palade, G.E. (1966) J. Cell Biol. 30, 73-76

31. Dallner, G., Siekevitz, P. & Palade, G.E. (1966) J. Cell Biol. 30, 97-117

32. De Wulf, H. & Hers, H.G. (1967) Eur. J. Biochem. 2, 50-56

33. De Wulf, H., Stalmans, W. & Hers, H.G. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 1-8

34. Ekman, P., Dahlquist, U., Humble, E. & Engstrom, L. (1976) Biochim. Biophys. Acta 429, 374-382

35. Exton, J.H., Lewis, S.B., Ho, R.J.,Robison, G.A. & Park, C.R. (1971) Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 85-100

36. Exton, J.H., Friedmann, N., Wong, E.H.A., Brineaux, J.P., Corbin, J.D. & Park, C.R. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3579-3588

37. Exton, J.H. (1979) in: Monographs on Endocrinology (Baxter, J.D. & Rousseau, G.G., eds.) Springer-Verlag, N.Y. 12, 535-546

38. Feliu, J.E., Coloma, J., Gomez-Lechon, M.-J., Garcia, M.D. & Baguena, J. (1982) Mol. Cell. Biochem. 45, 73-81

39. Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375-400

40. Foster, J.L. & Blair, J.B. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 263-276

41. Freedland, R.A. & Barnes, J.K. (1963) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 995-997

42. Garrison, J.C. & Borgland, M.K. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1129-1133

43. Gavin, J.R., Roth, J., Neville, D.M., Jr., De Meyts, P. & Buell, D.N. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 84-88

44. Gebhardt, R. (1976) Diplomarbeit, Universität Tübingen

45. Gebhardt, R. & Mecke, D. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 29-35

46. Gebhardt, R. & Mecke, D. (1979) Exptl. Cell Res. 124, 349-359

47. Gebhardt, R. (1980) Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Tübingen

48. Gebhardt, R. & Mecke, D. (1983) EMBO J. 2, 567-570

49. Glinsmann, W.H., Pauk, G. & Hern, E. (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun. 39, 774-782

50. Golden, S., Wals, P.A., Okajima, F. & Katz, J. (1979) Biochem. J. 182, 727-734

51. Good, C.A., Kramer, H. & Somogyi, M. (1933) J. Biol. Chem. 100, 485-491

52. Greengard, O. (1969) Science 163, 891-895

53. Grisham, J.W. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 349, 128-137

54. Gunderson, H.M. & Nordlie, R.C. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3552-3559

55. Gutmann, J. & Wahlefeld, A.W. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1510-1514

56. Gutmann, J. & Bergmeyer, H.U. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1842-1846

57. Hanks, J.H. & Wallace, R.E. (1949) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

58. Halestrap, A.P. (1978) Biochem. J. 172, 399-405

59. Hems, D.A., Whitton, P.D. & Taylor, E.A. (1972) Biochem. J. 129, 529-538

60. Hems, D.A. (1977) TIBS 2, 241-244

61. Hems, D.A. (1977) FEBS-Lett. 80, 237-245

62. Hers, H.G. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 167-191

63. Hers, H.G. & Van Schaftingen (1982) Biochem. J. 206, 1-12

64. Hopgood, M.F., Ballard, F.J., Reshef, L. & Hanson, R.W. (1973) Biochem. J. 134, 445-453

65. Hopgood, M.F., Clark, M.G. & Ballard, F.J. (1980) Biochem. J. 186, 71-79

66. Hopgood, M.F., Clark, M.G. & Ballard, F.J. (1981) Biochem. J. 196, 33-40

67. Hue, L. & Hers, H.G. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 540-548

68. Hue, L. (1979) Biochem. Soc. Trans. 7, 850-854

69. Hue, L. (1980) Adv. Enzymol. 52, 247-331

70. Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K., Tomita, Y., Aoyama, K., Kato, S. & Shinno, H. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA) 349, 77-84

71. Ingebretsen, W.R. & Wagle, S.R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 403-410

72. Jorgenson, R.A. & Nordlie, R.C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 5907-5915

73. Jungermann, K. & Sasse, D. (1978) TIBS 3, 198-202

74. Jungermann, K., Heilbronn, R., Katz, N. & Sasse, D. (1982) Eur. J. Biochem. 123, 429-436

75. Kahn, C.R., Neville, D.M. & Roth, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 244-250

76. Katz, J. & Rognstad, R. (1976) Curr. Top. Cell. Regul. 10, 237-289

77. Katz, J., Golden, S. & Wals, P.A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 73, 3433-3437

78. Katz, J., Wals, P.A. & Rognstad (1978) J. Biol. Chem. 253, 4530-4536

79. Katz, J., Golden, S. & Wals, P.A. (1979) Biochem. J. 180, 389-402

80. Katz, N., Teutsch, H.F., Sasse, D. & Jungermann, K. (1977) FEBS-Lett. 76, 226-230

81. Katz, N. (1979) Eur. J. Biochem. 98, 535-542

82. Keppens, S. & De Wulf, H. (1976) FEBS-Lett. 68, 278-282

83. Keppler, D. & Decker, K. (1974) in: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.) 3. Aufl., Bd. II, S. 1171-1175

84. Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becker, J.E. & Potter, V.R. (1975) Nature 256, 46-47

85. Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becker, J.E., Potter, V.R. & Butcher, F.R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3014-3020

86. Kletzien, R.F., Pariza, M.W., Becker, J.E. & Potter, V.R. (1976) J. Cell. Physiol. 89, 641-646

87. Kletzien, R.F., Weber, C.A. & Stumpo, D.J. (1981) J. Cell. Physiol. 109, 83-90

88. Krebs, H.A. (1972) Adv. Enz. Regul. 10, 397-420

89. Krebs, H.A., Lund, P. & Stubbs, M. (1976) in: Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species (Hanson, R.W. & Mehlman, M.A., eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapt. 8, pp 269-291

90. Krone, W., Marquardt, W., Seitz, H.J. & Tarnowski, W. (1976) Biochim. Biophys. Acta 451, 72-81

91. Le Bel, D., Poirier, G.G. & Beaudoin, A.R. (1978) Anal. Biochem. 85, 86-89

92. Leffert, H., Moran, T., Sell, S., Skelly, H., Ibsen, K., Mueller, M. & Arias, I. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75, 1834-1838

93. Leibovitz, A. (1963) Amer. J. Hyg. 78, 173

94. Leskes, A., Siekevitz, P. & Palade, G.E. (1971) J. Cell Biol. 49, 264-287

95. Leskes, A., Siekevitz, P. & Palade, G.E. (1971) J. Cell Biol. 49, 288-302

96. Lesniak, M.A. & Roth, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3720-3729

97. Lojda, Z., Gossrau, R. & Schiebler, T.H. (1976) Enzymhistochemische Methoden; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 81-83

98. Loofbourow, J.R., Gould, B.S. & Sizer, I.W. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 22, 406-412

98a. Lund, P. & Watford, M. (1976) in: The Urea Cycle (Grisolia, S., Báguena, R. & Mayor, F., eds.) pp. 479-488, John Wiley, New York

99. Lust, W.D., Passonneau, J.V. & Crites, S.V. (1975) Anal. Biochem. 68, 328-331

100. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

101. Ménard, D., Penasse, W., Drochmans, P. & Hugon, J.S. (1974) Histochem. 38, 229-239

102. Metzler, H. (1982) Dissertation, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie

103. Michalopoulos, G. & Pitot, H.C. (1975) Exptl. Cell Res. 94, 70-78

104. Milgrom, E., Thi, L., Atger, M. & Baulieu, E.E. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6366-6374

105. Miller, T.B. & Larner, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3483-3488

106. Miller, T.B., Jr. (1979) Biochim. Biophys. Acta 583, 36-46

107. Mukherjee, C., Caron, M.G. & Lefkowitz, R.J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 1945-1949

108. Nakamura, T., Aoyama, K., Kato, S., Tomita, Y. & Ichihara, A. (1979) in: Carcinoembryonic Proteins (Lehmann, F.-G., ed.) Vol. II, pp 723-728, Elsevier/ North-Holland, Amsterdam

109. Neupert, G. (1974) Acta histochem. 51, 255-264

110. Nordlie, R.C. (1971) in: The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) 3rd edn., Vol. 4, pp 543-608, Acad. Press, N.Y., London

111. Nordlie, R.C. (1974) Curr. Top. Cell. Regul. 8, 33-117

112. Oliver, I.T., Edwards, A.M. & Pitot, H.C. (1978) Eur. J. Biochem. 87, 221-227

113. Owen, O.E., Felig, P., Morgan, A.P., Wahren, J. & Cahill, G.F., Jr. (1969) J. Clin. Invest. 48, 574-583

114. Pariza, M.W., Becker, J.E., Yager, J.D., Jr., Bonney, R.J. & Potter, V.R. (1974) in: Differentiation and Control of Malignancy of Tumour Cells (Nakahara, W., Ono, T., Sugimura, T., Sugano, H., eds.) University Park Press, Baltimore, Md., pp 267-285

115. Pilkis, S.J., Park, C.R. & Claus, T.H. (1979) Vitam. Horm. (N.Y.) 36, 383-460

116. Proctor, E.B. & Nordlie, R.C. (1972) Arch. Int. Physiol. Biochim. 80, 461-467

117. Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Lougheed, W.M. & Lotto, W.N. (1954) Anat. Rec. 119, 11-34

118. Rappaport, A.M. (1976) Beitr. Path. 157, 215-243

119. Reid. L.M. & Rojkind, M. (1979) Meth. Enzymol. 58, 263-278

120. Rousseau, G.G., Martial, J. & De Visscher, M. (1976) Eur. J. Biochem. 66, 499-506

121. Ruderman, N.B., Aoki, T.T. & Cahill, G.F., Jr. (1976) in: Gluconeogenesis - Its Regulation in Mammalian Species (Hanson, R.W. & Mehlman, M.A., eds.) John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 515-532

122. Santos, A. & Blazquez, E. (1982) Eur. J. Biochem. 121, 671-677

123. Sasse, D., Katz, N. & Jungermann, K. (1975) FEBS-Lett. 57, 83-88

124. Scherer, R., Hoffmann, M., Emmelot, P. & Friedrich-Freksa, H. (1972) J. Natl. Canc. Inst. 49, 93-106

125. Schimke, R.T. (1963) J. Biol. Chem. 238, 1012-1018

126. Schirmer, G. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

127. Schudt, C. (1979) Eur. J. Biochem. 98, 77-82

128. Schudt, C. (1979) Eur. J. Biochem. 97, 155-160

129. Schudt, C. (1980) Biochim. Biophys. Acta 629, 499-509

130. Schudt, C. (1980) Biochim. Biophys. Acta 628, 277-285

131. Schulze, H.U. & Speth, M. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 505-514

132. Schwarz, G. (1978) Acta histochem. 62, 133-141

133. Seglen, P.O. (1973) FEBS-Lett. 30, 25-28

134. Seglen, P.O. (1973) Exptl. Cell Res. 82, 391-398

135. Seglen, P.O. (1974) Biochim. Biophys. Acta 338, 317-336

136. Seglen, P.O. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 182-187

137. Seglen, P.O., Gordon, P.B., Grinde, B., Solheim, A., Kovács, A.L. & Poli, A. (1981) Acta biol. med. germ. 40, 1587-1598

138. Shimazu, T. (1979) Acta Physiol. Pol. Suppl. 18, 1-18

139. Sirica, A.E., Richards, W., Tsukada, Y., Sattler, C.A. & Pitot, H.C. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 283-287

140. Snell, K. (1979) TIBS 4, 124-128

141. Soskin, S. (1940) Endocrinol. 26, 297-308

142. Soskin, S. & Levine, R. (1946) in: Carbohydrate Metabolism, Chapts. 16, 21, University of Chicago Press, Chicago

143. Spence, J.T. & Pitot, H.C. (1979) J. Biol. Chem. 254, 12331-12336

144. Speth, M. & Schulze, H.-U. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 134-141

145. Stalmans, W., De Wulf, H., Hue, L. & Hers, H.G. (1974)Eur. J. Biochem. 41, 127-134

146. Stalmans, W. (1976) Curr. Top. Cell. Regul. 11, 51-97

147. Stetten, M.R. & Burnett, F.F. (1967) Biochim. Biophys. Acta 139, 138-147

148. Stumpo, D.J. & Kletzien, R.F. (1981) J. Cell. Physiol. 107, 11-19

149. Tanaka, K., Sato, M., Tomita, V. & Ichihara, A. (1978) J. Biochem. 84, 937-946

150. Van Lan, V., Yamaguchi, N., Garcia, M.J., Ramey, E.R. & Penhos, J.C. (1974) Endocrinol. 94, 671

151. Wachstein, M. & Meisel, E. (1956) J. Histochem. Cytochem. 4, 592

152. Walli, A.K., Siebler, G., Zepf, E. & Schimassek, H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 353-362

153. Wanson, J.-C., Drochmans, P., Mosselmans, R. & Ronveaux, M.-F. (1977) J. Cell Biol. 74, 858-877

154. Wanson, J.-C., Bernaert, D., May, C., Deschuyteneer, M. & Prieels, J.-P. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci (USA) 349, 413-415

155. Wanson, J.-C., Penasse, W., Bernaert, D. & Popowski, A. (1981) Eur. J. Cell Biol. 24, 88-96

156. Waymouth, C. (1959) J. Natl. Canc. Inst. 22, 1003-1015

157. Whitton, P.D. & Hems, D.A. (1975) Biochem. J. 150, 153-165

158. Whitton, P.D. & Hems, D.A. (1975) Horm. Metab. Res. 7, 524

159. Whitton, P.D. & Hems, D.A. (1976) Biochem. J. 156, 585-592

160. Whitton, P.D. & Hems, D.A. (1977) FEBS-Lett. 74, 195-200

Lebenslauf

Am 8. März 1949 wurde ich als fünftes von acht Kindern des Bäckers Joseph Schirmer und seiner Ehefrau Anna, geb. Stumpf, in Walldürn (Baden) geboren.

Im Jahre 1955 trat ich in die Grundschule in Walldürn ein und wechselte nach 5 Jahren, im April 1960, auf das Burghardt-Gymnasium in Buchen (Odenwald) über. Hier legte ich im Juni 1969 die Reifeprüfung ab.

Nach einer zweijährigen Dienstzeit in der Bundeswehr (von Juli 1969 bis Juli 1971) nahm ich im Oktober 1971 das Studium der Biochemie an der Universität Tübingen auf. Hier legte ich am 5. Oktober 1972 den ersten und am 10. April 1974 den zweiten Teil der Diplom-Vorprüfung ab. Den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung legte ich im November 1976 ab. Anschließend arbeitete ich an meiner Diplomarbeit: "Zeitlicher Verlauf von Enzymaktivitäten, Glucagonsensitivität und DNS-Synthese in Hepatozytenkulturen", die ich im September 1978 abschloß.

Von Oktober 1978 bis Juli 1983 wurde die vorliegende Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen erarbeitet. Thema:"Hormonelle Langzeitregulation von Glykogengehalt, Gluconeogenese und Glucose-6-Phosphatase in Primärkulturen von Rattenhepatozyten".

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Professoren und Dozenten:

Anatomie:	K. Mörike
Anorganische Chemie:	W. Rüdorff
Biochemie:	G. Weitzel, D. Mecke
Botanik:	H. Metzner
Mikrobiologie:	H. Zähner, H. Wolf
Organische Chemie:	E. Bayer, E. Müller
Pflanzenphysiologie:	H. Metzner
Pharmakologie:	H. Remmer
Physik:	H. Krüger, F. Gönnenwein
Physikalische Biochemie:	K. Wegmann
Physikalische Chemie:	H. Mauser
Physiologie:	E. Betz
Zoologie:	K.G. Grell

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)